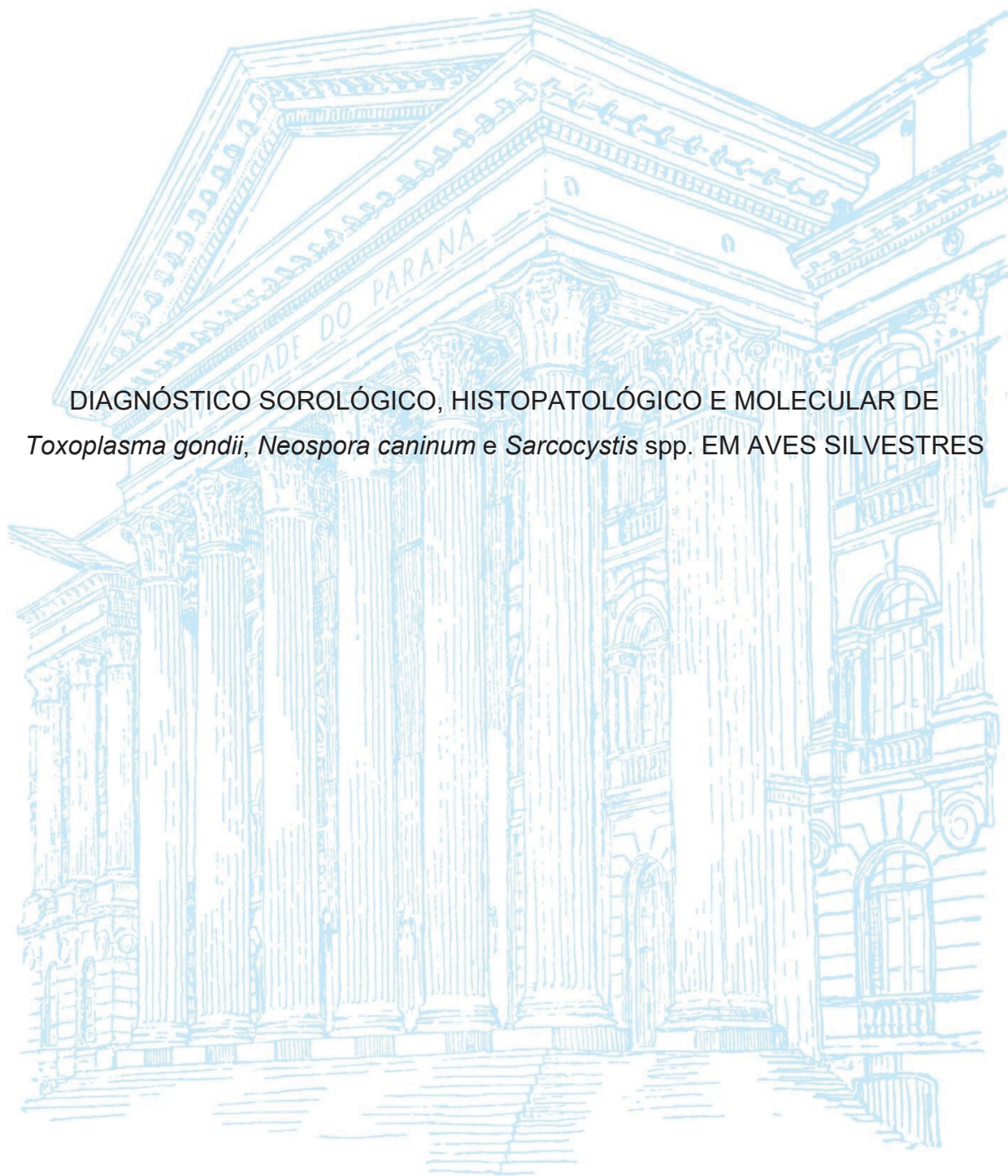


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA SATO

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO, HISTOPATOLÓGICO E MOLECULAR DE
Toxoplasma gondii, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. EM AVES SILVESTRES



CURITIBA

2022

ANA PAULA SATO

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO, HISTOPATOLÓGICO E MOLECULAR DE
Toxoplasma gondii, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. EM AVES SILVESTRES

Tese apresentada ao Programa 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.

Orientadora: Dra. Rosangela Locatelli Dittrich.

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Sato, Ana Paula

Diagnóstico sorológico, histopatológico e molecular de
Toxoplasma gondii, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. em
aves silvestres. / Ana Paula Sato. – Curitiba, 2022.
1 recurso online: PDF.

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

Orientadora: Profa. Rosangela Locatelli Dittrich.

1. Toxoplasmose. 2. Zoonoses. 3. Protozoários. 4. Aves
silvestres. I. Dittrich, Rosangela Locatelli. II. Universidade Federal
do Paraná. Programa de Pós-Graduação Ciências Veterinárias.
III. Título.

Bibliotecário: Douglas Alex Jankoski CRB-9/1167



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de ANA PAULA SATO intitulada: **Diagnóstico sorológico, histopatológico e molecular de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. em aves silvestres**, sob orientação da Profa. Dra. ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 05 de Outubro de 2022.

Assinatura Eletrônica

11/10/2022 10:44:21.0

ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

10/10/2022 09:06:54.0

MARIA CONSTANZA RODRIGUEZ
Avaliador Externo (ADAPAR)

Assinatura Eletrônica

10/10/2022 08:50:40.0

LUÍS FERNANDO PITA GONDIM
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA)

Assinatura Eletrônica

10/10/2022 08:53:49.0

LUIZ DANIEL DE BARROS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

Assinatura Eletrônica

10/10/2022 15:59:04.0

ROGERIO RIBAS LANGE
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

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

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

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 225964

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 225064

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto e me acompanharam nessa caminhada.

As minhas mães, Luiza e Fumico, por todo o amor, apoio, suporte e compreensão. Agradeço por sempre vibrarem com as minhas conquistas e me guiarem a trilhar o caminho do conhecimento.

A minha tia Mieko por sempre vibrar com as minhas conquistas na ciência e me chamar de “morena linda da tia”.

A minha orientadora Prof. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich, pela orientação, apoio e confiança. Obrigada por todo conhecimento repassado, palavras de incentivo e por ter me dado a oportunidade de trabalhar e pesquisar esses protozoários tão interessantes.

Ao Prof. Dr. Rogério Ribas Lange pela sabedoria e por todos os ensinamentos sobre animais silvestres.

Aos membros da banca, Dra. Maria Constanza Rodriguez, Prof. Dr. Luís Fernando Pita Gondim, Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros e Prof. Dr. Rogério Ribas Lange pela disponibilidade em avaliar meu trabalho e por todas as sugestões dadas.

Ao Prof. Msc. Renato Silva de Sousa e aos residentes do Laboratório de Patologia Veterinária por serem sempre pacientes e me auxiliarem nas coletas das amostras.

Ao Dr. Rafael Calero Bernal, por todo conhecimento compartilhado, pela amizade e por ser sempre paciente e disposto a tirar minhas dúvidas.

Ao Dr. Petras Prakas, pela colaboração científica, amizade e por todo conhecimento compartilhado.

As minhas amigas Aline Luiza Konell, Flávia Moreira da Fonseca e Luciana Doria Ribeiro Cabral que acompanharam essa caminhada. Obrigada pela amizade, troca de conhecimentos, cafés, parceria nas análises e palavras de apoio.

À técnica de laboratório Louise Cristine Candido da Silva, pela amizade, ajuda na preparação dos reagentes, parceria no cultivo celular e nas práticas de docência, conversas e risadas no laboratório.

Ao técnico de laboratório Olair Carlos Beltrame, pela amizade, cafés e ajuda na preparação dos reagentes.

A todos os funcionários e amigos do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná pela amizade, companherismo, risadas, cafés, convivência e aprendizados diários.

A todas as instituições e os laboratórios que foram parceiros na realização deste trabalho: Universidade Federal do Paraná (UFPR), Parque das Aves, Zoológico de Curitiba, Instituto Água e Terra (IAT), Centro de Apoio à Fauna Silvestre (CAFS), Projeto de Monitoramento de praias Bacia de Santos (PMP-BS), Centro Técnico Histopatológico de Curitiba (CHTC) e Laboratório de criação e incubação de animais alternativos, silvestres e exóticos (LACRIAS – UFPR).

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, por todos os ensinamentos transmitidos.

A toda equipe do grupo de pesquisa de protozoologia do *Moredun Research Institute*, em especial ao Dr. Frank Katzer e ao Dr. Paul Bartley pelo acolhimento, amizade e orientações científicas durante o doutorado sanduíche.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e CAPES PRINT, pela concessão da bolsa de doutorado e de doutorado sanduíche.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, Gislaine Klemba e Felipe Figueredo França Merlo pela paciência e dedicação com os alunos.

A todos os animais, por me ensinarem tanto sobre a vida, a todo instante.

Aqueles que, embora não nomeados, de alguma forma me prestaram ajuda em distintos momentos, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada.

“Conhecer, saber mais da interessantíssima vida das aves, é o primeiro passo para estimular o sentimento de conservar a natureza, que atualmente passa por tantos perigos” Helmut Sick (1997)

“Nosso amor pelas estrelas é grande demais para termos medo da noite” Epitáfio no túmulo de dois astrônomos amadores.

RESUMO

As aves silvestres estão propensas a infecção por agentes infecciosos e parasitários de importância para a saúde pública e conservação ambiental. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. são protozoários do filo Apicomplexa, possuem distribuição mundial e infectam várias espécies de animais domésticos e silvestres, inclusive as aves. O Brasil tem muitas espécies de aves, com vasta diversidade de avifauna e há poucos estudos sobre o diagnóstico destes protozoários nas aves silvestres. A presente tese foi dividida em quatro capítulos. O objetivo do capítulo I foi verificar a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii*, anti-*N. caninum* e anti-*Sarcocystis* spp. em aves silvestres. Amostras de plasma de 132 aves silvestres foram testadas para anticorpos para os três protozoários por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Na RIFI, das 132 amostras, 3,78% (5/132) foram positivas para *T. gondii* e 12,1% (16/132) foram positivas para *Sarcocystis* spp. Anticorpos anti-*T. gondii* foram detectados em um rapinante, um psitacédeo e em três aves marinhas. Anticorpos anti-*Sarcocystis* spp. foram detectados em cinco rapinantes, sete psitacédeos e quatro aves marinhas. Não foram detectados anticorpos anti-*N. caninum*. O objetivo do capítulo II foi detectar ácidos nucleicos (DNA) de *T. gondii* e *N. caninum* nas amostras de tecido de 47 aves marinhas por meio da nested PCR (nPCR). Das 47 aves marinhas investigadas, DNA de *T. gondii* foi encontrado em 14,8% (7/47) e DNA de *N. caninum* em 17% (8/47) aves marinhas. O objetivo do capítulo III foi identificar espécies de *Sarcocystis* em amostras de tecidos de aves marinhas por meio da análise molecular e histopatológica. Foram coletadas amostras de tecidos (musculatura peitoral, coração e cérebro) de 47 aves marinhas. Uma porção de cada tecido foi fixada em formalina tamponada a 10% para análise histopatológica enquanto o DNA foi extraído de outra porção para a análise molecular. *Sarcocystis* spp. foi identificado em 31,9% (15/47) aves marinhas de cinco espécies. Na microscopia foram identificados cistos de *Sarcocystis* na musculatura peitoral e na musculatura cardíaca. O capítulo IV objetivou realizar o diagnóstico molecular e histopatológico de *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. em aves silvestres. Foram coletadas amostras de tecidos (musculatura peitoral, coração e cérebro) de 63 aves silvestres de 11 ordens taxonômicas. Das 63 aves silvestres analisadas, 2 (3,17%) foram positivas na n(PCR) para *T. gondii* e 20 (31,7%) foram positivas para *Sarcocystis* spp. Na microscopia foram identificados sarcocistos de parede fina ($\leq 1 \mu\text{m}$) e de parede espessa ($\geq 2 \mu\text{m}$). Os resultados sorológicos e moleculares demonstraram que as aves silvestres foram expostas aos protozoários *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. Algumas espécies de aves marinhas apresentaram anticorpos (IgY - IgG) na RIFI e posteriormente detecção de DNA de *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. em tecidos post-mortem de animais das mesmas espécies. Por outro lado, *N. caninum* só pode ser detectado na PCR dos tecidos de algumas aves, sem a detecção de anticorpos em nenhuma das espécies estudadas. Mais estudos sorológicos e moleculares são necessários para entender a epidemiologia destes protozoários e seu impacto na saúde das aves.

Palavras-chave: Toxoplasmose, protozoários, rapinantes, aves marinhas, psitacédeos, RIFI, PCR.

ABSTRACT

Wild birds are prone to infection by infectious and parasitic agents of importance to public health and environmental conservation. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp. belong to the phylum Apicomplexa, have a worldwide distribution, and infect several species of domestic and wild animals, including birds. Brazil has many species of birds, with a vast diversity of avifauna and free-living birds are of great importance in the cycle of parasites in an ecosystem. There are few studies on the diagnosis of these protozoa in wild birds. This thesis was divided into four chapters. The aim of the chapter I was to verify the occurrence of antibodies anti-*T. gondii*, anti-*N. caninum* and anti-*Sarcocystis* spp. in wild birds. Plasma samples from 132 wild birds were tested for detection of antibodies to the three protozoans using the indirect immunofluorescence antibody Test (IFAT). Of the 132 samples, 3.78% (5/132) were positive for *T. gondii* and 12.1% (16/132) were positive for *Sarcocystis* spp. Antibodies to *T. gondii* were detected in one raptor, one parrot and in three seabirds. Antibodies to *Sarcocystis* spp. were detected in five raptors, seven birds from Psittacidae family and in four seabirds. Plasma antibodies to *N. caninum* were not detected. The aim of Chapter II was to detect nucleic acids (DNA) of *T. gondii* and *N. caninum* in tissue samples from 47 seabirds using nested PCR. Of the 47 seabirds investigated, *T. gondii* DNA was found in 14.8% (7/47) and *N. caninum* DNA in 17% (8/47) seabirds. The aim of Chapter III was to identify *Sarcocystis* species in tissue samples from seabirds through molecular and histopathological analysis. Tissue samples (pectoral muscles, heart and brain) were collected from 47 seabirds. A portion of each tissue was fixed in 10% buffered formalin for histopathological analysis while DNA was extracted from another portion for molecular analysis. *Sarcocystis* spp. was identified in 31.9% (15/47) seabirds of five species. Microscopic cysts were identified in the pectoral and cardiac muscles. Chapter IV aimed to carry out the molecular and histopathological diagnosis of *T. gondii*, *N. caninum* and *Sarcocystis* spp. in wild birds. Tissue samples (pectoral muscles, heart and brain) were collected from 63 wild birds of 11 taxonomic orders. Of the 63 wild birds analyzed, two (3.17%) were positive in nPCR for *T. gondii* and 20 (31.7%) were positive for *Sarcocystis* spp. The microscopy analysis identified thin-walled ($\leq 1 \mu\text{m}$) and thick-walled ($\geq 2 \mu\text{m}$) sarcocysts. Serological and molecular results demonstrated that wild birds were exposed to *T. gondii* and *Sarcocystis* spp. Some species of seabirds showed antibodies (IgY - IgG) in IFAT and later detection of DNA from *T. gondii* and *Sarcocystis* spp. in tissues samples of the same seabirds' species. On the other hand, *N. caninum* can only be detected in the PCR of tissues of some birds, with no detection of antibodies in any of the studied species. More serological and molecular studies are needed to understand the epidemiology of these protozoans and their impact on wild birds' health.

Key words: Toxoplasmosis, protozoa, raptors, seabirds, parrots, IFAT, PCR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 Objetivo geral	16
1.1.2 Objetivos específicos	16
REFERÊNCIAS	17
2 CAPÍTULO I – OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-<i>Toxoplasma gondii</i>, ANTI-<i>Neospora caninum</i> E ANTI-<i>Sarcocystis</i> spp. EM AVES SILVESTRES DA REGIÃO SUL DO BRASIL	21
ABSTRACT	22
Key words: Raptors, toxoplasmosis, seabirds, IFAT, protozoa	22
2.1 INTRODUÇÃO	23
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.2.1 Aves	25
2.2.2 Amostras	26
2.2.3 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	26
2.2.4 Análise estatística	27
2.3 RESULTADOS	27
2.4 DISCUSSÃO	29
2.5 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	34
3 CAPÍTULO II - MOLECULAR DETECTION OF <i>Toxoplasma gondii</i> AND <i>Neospora caninum</i> IN SEABIRDS FROM SOUTHERN BRAZIL	40
3.1 INTRODUCTION	41
3.2 MATERIAL AND METHODS	42
3.2.1 Study area	42
3.2.2 Sample collection	43

3.2.3 Tissue digestion and DNA extraction	43
3.2.4 Nested PCR (nPCR).....	44
3.2.5 Sequencing	45
3.2.6 Statistical analysis	45
3.3 RESULTS.....	45
3.4 DISCUSSION	48
3.5 CONCLUSION	51
REFERENCES.....	52
4 CAPÍTULO III - MOLECULAR CHARACTERIZATION OF <i>Sarcocystis</i> spp. IN SEABIRDS FROM SOUTHERN BRAZIL	57
4.1 INTRODUCTION.....	59
4.2 MATERIAL AND METHODS	60
4.2.1 Ethical statement.....	60
4.2.2 Study area and sample gathering.....	60
4.2.3. Necropsy, histopathology, and fresh tissue sampling.....	61
4.2.4 Tissue digestion and DNA extraction	62
4.2.5 Nested PCR and sequencing	62
4.2.6. Sequence analyses	63
4.3 RESULTS.....	63
4.3.1 Molecular and phylogenetic investigation	63
4.3.3 Histology.....	68
4.4 DISCUSSION	70
4.5 CONCLUSIONS	73
REFERENCES.....	74
5 CAPÍTULO IV - DIAGNÓSTICO MOLECULAR E HISTOPATOLÓGICO DE <i>Toxoplasma gondii</i>, <i>Neospora caninum</i> E <i>Sarcocystis</i> spp. EM AVES SILVESTRES NO PARANÁ	81
5.1 INTRODUÇÃO	83

5.2 MATERIAL E MÉTODOS	85
5.2.1 Aves	85
5.2.2 Histopatologia e coleta de amostras para <i>nested</i> PCR (<i>nPCR</i>)	85
5.2.3 Digestão dos Tecidos	86
5.2.4 Extração de DNA.....	86
5.2.5 Reação em cadeia da polimerase <i>nested</i> (<i>nPCR</i>)	87
5.2.6 Sequenciamento Sanger	87
5.3 RESULTADOS	88
5.3.1 <i>nPCR</i> – ITS1	88
5.3.2 Histopatologia.....	93
5.4 DISCUSSÃO	98
5.5 CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS	102
CONSIDERAÇÕES FINAIS	110
REFERÊNCIAS.....	112
ANEXO 1 – Certificado Comitê de Ética - CEUA UFPR	127
ANEXO 2 – Autorização SISBIO	128
ANEXO 3 – Ofício alteração do título do projeto	129

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui 1.971 espécies de aves e está entre os países com maior riqueza e diversidade de avifauna (PIACENTINI *et al.*, 2015; PACHECO *et al.*, 2021). Entre os principais táxons superiores, reconhecem-se 33 ordens, 102 famílias, 85 subfamílias e 732 gêneros distribuídos nos diversos biomas brasileiros (PACHECO *et al.*, 2021).

As aves formam um dos mais fascinantes grupos de animais e podem ser encontradas nos mais diversos ambientes, onde desempenham importantes funções ecológicas. Elas participam ativamente na dispersão de sementes, polinização de plantas além do controle de insetos e de pequenos vertebrados (VIELLIARD, 2000; CLARK *et al.*, 2004). Além disso as aves são consideradas sentinelas ecológicas da saúde ambiental por pertencerem a todos os níveis da cadeia trófica e por serem sensíveis a variações climáticas e aos impactos ambientais naturais ou impostos pelas ações antrópicas (VIELLIARD, 2000; SEKERCIOGLU, 2006).

Devido à diversidade de hábitos alimentares, ao sinantropismo de algumas espécies, à dependência de diferentes ambientes para suas atividades vitais, e ao comportamento reprodutivo em colônias observado em algumas espécies, as aves estão propensas a infecção por agentes parasitários de importância para a saúde pública e conservação ambiental (MALLORY *et al.*, 2010; BARBOSA *et al.*, 2011; de MATOS *et al.*, 2020).

Os protozoários intracelulares *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. pertencem ao filo Apicomplexa e a família Sarcocystidae. Possuem distribuição mundial e infectam várias espécies de animais domésticos e silvestres, inclusive as aves (DUBEY *et al.*, 2007; PRAKAS *et al.*, 2012; DUBEY, 2021). As aves se infectam pela ingestão de alimentos e água contaminados com esporocistos e oocistos esporulados, e por meio da ingestão de cistos em tecidos infectados (DUBEY, 2010, ANDRADE *et al.*, 2016).

A toxoplasmose é uma zoonose causada por *T. gondii*. É uma doença de importância na saúde pública por ser cosmopolita, apresentar-se como infecção oportunista nos casos de imunossupressão e por causar impactos econômicos na produção animal devido às perdas por morte e aborto (FIALHO *et al.*, 2009; DUBEY, 2021). Os gatos domésticos e os felídeos silvestres são os hospedeiros definitivos de

T. gondii e os seres humanos, juntos com uma grande variedade de animais domésticos e silvestres, são hospedeiros intermediários (AL-ADHAMI *et al.*, 2016; DUBEY, 2021). Estima-se que um terço da população humana é soropositiva e que 42-61% dos casos de toxoplasmose adquirida são de origem alimentar (ALVARADO-ESQUIVEL *et al.*, 2014; HALD *et al.*, 2016; AMOUIEI *et al.*, 2018). A ampla distribuição geográfica, a capacidade de infectar vários hospedeiros e a persistência no ambiente são algumas características epidemiológicas importantes desse parasito que o posicionam como um patógeno de interesse na conservação (WILSON *et al.*, 2020). A epidemiologia de *T. gondii* foi alterada por vários fatores com o desenvolvimento agrícola, a modificação da paisagem, a mudança climática (SHAPIRO *et al.*, 2010; YAN *et al.*, 2016) e a introdução e disseminação de gatos domésticos soltos em todo o mundo (De WIT *et al.*, 2017; WILSON *et al.*, 2020).

As aves têm um papel significativo na epidemiologia da toxoplasmose e são consideradas importantes hospedeiras intermediárias deste protozoário pois além de servirem como fonte de infecção para os felídeos, as espécies de aves que se alimentam no solo são consideradas sentinelas de contaminação ambiental com oocistos (LOSS *et al.*, 2013; GENNARI *et al.*, 2014). O parasito *T. gondii* já foi isolado de várias espécies de aves silvestres em vários continentes, no entanto estudos com a avifauna brasileira são escassos (DUBEY, 2002; DUBEY, 2021).

A neosporose é causada pelo parasito intracelular obrigatório *N. caninum* que tem como hospedeiro definitivo os cães domésticos e algumas espécies de canídeos silvestres (MCALLISTER *et al.*, 1998, GONDIM *et al.*, 2004; DONAHOE *et al.*, 2015). A doença causa aborto em bovinos e sinais neurológicos em cães (DUBEY; SHARES, 2007; CERQUEIRA-CEZAR *et al.*, 2017). Por causar aborto, aumenta os prejuízos econômicos nos rebanhos. Com base em dados de isolamento do parasito, bem como detecção de DNA e anticorpos, vários mamíferos domésticos e silvestres e algumas espécies de aves atuam como hospedeiros intermediários (DUBEY; SHARES, 2007; DONAHOE *et al.*, 2015). Muitos estudos sorológicos foram realizados em animais domésticos e silvestres (DONAHOE *et al.*, 2015; CERQUEIRA-CEZAR *et al.*, 2017) e a importância das aves domésticas na epidemiologia da neosporose foi relatada em estudos de fatores de risco que demonstraram associações significativas entre o número de cães, a presença de aves e o aumento de soropositividade nos rebanhos de bovinos (OTRANTO *et al.*, 2003). O real papel das aves no ciclo de *N. caninum* ainda é incerto (de BARROS *et al.*, 2018), apesar da detecção de anticorpos anti-*N.*

caninum no soro, e DNA em tecidos de aves de vida livre sugerirem que elas podem contribuir na transmissão pelo ciclo silvestre (ROCCHIGIANI *et al.*, 2017; CERQUEIRA-CEZAR *et al.*, 2017).

Os parasitos *Sarcocystis* spp. são coccídios formadores de cistos que são capazes de infectar mamíferos, aves e répteis (PRAKAS *et al.*, 2020). O gênero possui mais de 200 espécies nomeadas, porém o ciclo de vida completo é conhecido apenas para 26 espécies (DUBEY *et al.*, 2016; GONDIM *et al.*, 2021). São protozoários heteroxenos obrigatórios sendo que a multiplicação assexuada do parasito com formação de cistos maduros ocorre na musculatura dos hospedeiros intermediários que normalmente é um animal onívoro enquanto a fase sexuada com formação de oocistos/espocistos ocorre no intestino delgado dos hospedeiros definitivos, normalmente um animal carnívoro (GJERDE *et al.*, 2018). O hospedeiro definitivo se infecta por meio da ingestão de cistos teciduais (sarcocistos) presentes nos tecidos musculares dos hospedeiros vertebrados herbívoros ou onívoros, chamados de hospedeiros intermediários (PRAKAS *et al.*, 2012; GJERDE *et al.*, 2014). Animais herbívoros e onívoros geralmente se infectam por meio da ingestão de esporocistos em água ou alimentos contaminados (PRAKAS *et al.*, 2012; DUBEY, 2016). Até o momento, 27 espécies de *Sarcocystis* foram identificadas nas aves (MACÁ *et al.*, 2021). Duas das espécies mais estudadas em aves, *Sarcocystis falcatula* e *Sarcocystis calchasi* são patogênicas para as aves e podem induzir lesões pulmonares graves e meningoencefalite (WÜNSCHMANN *et al.*, 2009; RIMOLDI *et al.*, 2013). Alguns estudos morfológicos e moleculares já foram conduzidos em aves na Europa e várias espécies de *Sarcocystis* foram identificadas, porém poucos estudos para reconhecer a diversidade de *Sarcocystis* spp. em aves no Brasil foram conduzidos.

O Brasil tem muitas espécies de aves, com vasta diversidade de avifauna e as aves de vida livre têm grande importância no ciclo dos parasitos em um ecossistema. Os fatores que justificam o presente estudo são a falta de dados sobre a ocorrência desses protozoários no Brasil, a escassez de literatura na investigação epidemiológica e molecular, a falta do diagnóstico, a infecção pelos protozoários como causa de morte das aves e a falta de conhecimento sobre o papel da espécie de ave no ciclo do parasito. Elucidar o papel das aves no ciclo dos protozoários auxilia no delineamento de ações para a prevenção e controle destas doenças.

A partir da necessidade de novas pesquisas, a presente tese foi desenvolvida e dividida em quatro capítulos. O primeiro capítulo intitulado “Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, anti-*Neospora caninum* e anti-*Sarcocystis* spp. em aves silvestres” aborda a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, anti-*N. caninum* e anti-*Sarcocystis* spp. em amostras de plasma de 132 aves silvestres. O segundo capítulo com o título “Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in seabirds from southern Brazil” aborda a detecção molecular de *T. gondii*, *N. caninum* em aves marinhas. O terceiro capítulo intitulado “Molecular characterization of *Sarcocystis* spp. in seabirds from southern Brazil” aborda a identificação e caracterização molecular de *Sarcocystis* spp. em aves marinhas e o quarto capítulo com o título “Diagnóstico molecular e histopatológico de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. em aves silvestres” aborda o diagnóstico molecular e histopatológico de *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. em aves silvestres de várias ordens taxonômicas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Realizar o diagnóstico sorológico, histopatológico e molecular de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. em aves silvestres.

1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii*, anti-*N. caninum* e anti-*Sarcocystis* spp. em amostras de plasma de aves silvestres.
- Detectar DNA de *T. gondii*, *N. caninum* e de *Sarcocystis* spp. em amostras de tecidos de aves silvestres.
- Realizar o diagnóstico histopatológico de *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. em aves silvestres.
- Realizar caracterização molecular dos protozoários da família Sarcocystidae detectados.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o número de protocolo 061/2018 e pelo ICMBio através do sistema de autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob o número de protocolo 64096-2

REFERÊNCIAS

- AL-ADHAMI, B. H.; SIMARD, M.; HERNÁNDEZ-ORTIZ, A.; BOIREAU, C.; GAJADHAR, A. A. Development and evaluation of a modified agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection using tachyzoites cultivated in cell culture. **Food and Waterborne Parasitology**, v.2, p.15-21, 2016.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; PACHECO-VEGA, S. J.; HERNÁNDEZ-TINOCO, J.; SÁNCHEZ-ANGUIANO, L. F.; BERUMEN-SEGOVIA, L. O.; RODRÍGUEZ-ACEVEDO, F. J. I.; GÜERECÁ-GARCÍA, O. A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection and associated risk factors in Huicholes in Mexico. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p.1-7, 2014.
- AMOUEI, A.; SHARIF, M.; HOSSEINI, S. A.; SARVI, S.; MIZANI, A.; SALEHI, S.; DARYANI, A. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic and migrating birds from Mazandaran province, Northern Iran. **Avian Biology Research**, v.11, n.1, p.12-15, 2018.
- ANDRADE, L.H.M.; LUGARINI, C.; OLIVEIRA, R.A.S.; SILVA, L.T.R.; MARVULLO, M.F.V.; GARCIA, J.E.; DUBEY, J.P.; SILVA, J.C.R. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em aves silvestres de três unidades de conservação federais da Paraíba e da Bahia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p.103-107, 2016.
- BARBOSA, A.D.; MARTINS, N.R.S.; MAGALHAES, 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.
- CERQUEIRA-CÉZAR, C.K.; CALERO-BERNAL, R.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; All about neosporosis in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.26, n.3, p.253-279, 2017.
- CLARK, C. J.; POULSEN, J. R.; CONNOR, E. F.; PARKER, V.T. Fruiting trees as dispersal foci in a semi-deciduous tropical forest. **Ecology**, v.139 p. 66-75, 2004.
- de BARROS, L.D.; MIURA, A.C.; MINUTTI, A.F.; VIDOTTO O.; GARCIA J.L., *Neospora caninum* in birds: A review. **Parasitology International**, v. 67 p.397–402, 2018.
- de MATOS, A. M. R. N.; DOMIT, C.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Seabirds: Studies with parasitofauna and potential indicator for environmental anthropogenic impacts. **Semina Ciências Agrárias**, v.41, n. 4, p.1439–1450, 2020.

de WIT, L. A.; CROLL, D. A.; TERSHY, B.; NEWTON, K. M.; SPATZ, D. R.; HOLMES, N. D. & KILPATRICK, A. M. Estimating burdens of neglected tropical zoonotic diseases on islands with introduced mammals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 3, p.749, 2017.

DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D. & ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, p. 216–238, 2015.

DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 121–153, 2002.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p.323-367, 2007.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of animals and humans** CRC Press 2 ed, p. 1-313, 2010.

DUBEY, J.P.; CALERO-BERNAL, R.; ROSENTHAL, B.M.; SPEER, C.A.; **Sarcocystosis of animals and humans**, CRC Press, 2 ed. 2016.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of animals and humans** CRC Press 3 ed, p. 1-353, 2021.

FIALHO, C. G.; TEIXEIRA, M. C.; ARAÚJO, F. A. P. Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, p.1-23, 2009.

GENNARI, S.M.; OGRZEWALSKA, M.; SOARES, H.S.; SARAIVA, D.G.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B.; DUBEY, J.P. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in birds from the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.200, p.193-197, 2014.

GJERDE, B; JOSEFSEN, T.D. Molecular characterisation of *Sarcocystis lutrae* n. sp. and *Toxoplasma gondii* from the musculature of two Eurasian otters (*Lutra lutra*) in Norway. **Parasitology Research**, 114 p. 873–886. 2014

GJERDE, B.; VIKØREN, T.; HAMNES, I.S. Molecular identification of *Sarcocystis halleti* n. sp., *Sarcocystis lari* and *Sarcocystis truncata* in the intestine of White-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Norway. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.7, p. 1-11, 2018.

GONDIM, L.F.P., MCALLISTER, M.M., PITT, W.C., ZEMLICKA, D.E., Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*, **International Journal for Parasitology**, v. 34, p.159–161, 2004.

GONDIM, L.F.P.; SOARES, R.M.; MORÉ, G; de JESUS, R.F.; LLANO, H.A.B. *Sarcocystis neurona* and related *Sarcocystis* spp. shed by opossums (*Didelphis* spp.)

in South America. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.30, n.3, p. e006521, 2021.

HALD, T.; ASPINALL, W.; DEVLEESSCHAUWER, B.; COOKE, R.; CORRIGAN, T.; HAVELAAR, A.H.; GIBB, H.J.; TORGERSON, P.R.; KIRK, M.D.; ANGULO, F.J.; et al. World Health Organization Estimates of the Relative Contributions of Food to the Burden of Disease Due to Selected Foodborne Hazards: A Structured Expert Elicitation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0145839, 2016.

LOSS, S. R.; WILL, T.; MARRA, P. P. The impact of free-ranging domestic cats on wildlife of the United States. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2013.

MÁCA, O.; GONZÁLEZ-SOLÍS, D. *Sarcocystis cristata* sp. nov. (Apicomplexa, Sarcocystidae) in the imported great blue turaco *Corythaeola cristata* (Aves, Musophagidae). **Parasites & Vectors**, v.14, p.1-7, 2021.

MALLORY, M. L.; ROBINSON, S. A.; HEBERT, C. E.; FORBES, M. R. Seabirds as indicators of aquatic ecosystem conditions: A case for gathering multiple proxies of seabird health. **Marine Pollution Bulletin**, v.60, p. 7-12, 2010.

MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1473–1478, 1998.

OTRANTO, D.; LAZARI, A.; TESTINI, G.; TRAVERSA, D.; REGALBONO, A.F.; BADAN, M.; CAPELLI, G. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.118, p.7-18, 2003.

PACHECO, J.F.; SILVEIRA, L.F.; ALEIXO, A.; AGNE, C.E.; BENCKE, G.A.; BRAVO, G.A.; BRITO, G.R.R.; COHN-HAFT, M.; MAURÍCIO, G.N.; NAKA, L.N.; OLMOS, F.; POSSO, S.; LEES, A.C.; FIGUEIREDO, L.F.A.; CARRANO, E.; GUEDES, R.C.; CESARI, E.; FRANZ, I.; SCHUNCK, F. & PIACENTINI, V.Q. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee – second edition. **Ornithology Research**, v. 29(2), p.1-123, 2021.

PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. **Ekologija**, v. 58, p. 45-58, 2012.

PRAKAS P, BUTKAUSKAS D, JUOZAITYTĖ-NGUGU E. Molecular identification of four *Sarcocystis* species in the herring gull, *Larus argentatus*, from Lithuania. **Parasites & Vectors**, v. 613(1), p. 1-6, 2020.

PIACENTINI, V. Q.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; MAURÍCIO, G. N.; PACHECO, J. F.; BRAVO, G. A.; BRITO, G. R. R.; NAKA, L. N.; OLMOS, F.; POSSO, S.; SILVEIRA, L. F.; BETINI, G. S.; CARRANO, E.; FRANZ, I.; LEES, A. C.; LIMA, L. M.; PIOLI, D.; SCHUNCK, F.; AMARAL, F. R.; BENCKE, G. A.; COHN-HAFT, M.; FIGUEIREDO, L. F. A.; STRAUBE F. C. & CESARI, E. 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. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.23(2) p.91–298, 2015.

RIMOLDI, G.; SPEER, B.; WELLEHAN JR, J. F.; BRADWAY, D. S.; WRIGHT, L.; REAVILL, D.; Chin, R. P. An outbreak of *Sarcocystis calchasi* encephalitis in multiple psittacine species within an enclosed zoological aviary. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 6, p.775-781, 2013.

ROCCHIGIANI, G.; POLI, A.; NARDONI, S.; PAPINI, R.; MANCIANTI, F. *Neospora caninum* in Wild Waterfowl: Occurrence of Parasite DNA and Low Antibody Titers. **The Journal of Parasitology**, v.103, n.1, p. 142–145, 2017.

SEKERCIOGLU, C. H.; Increasing awareness of avian ecological function. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 21, n. 8, p. 464-471, 2006.

SHAPIRO, K.; CONRAD, P. A.; MAZET, J. A. K.; WALLENDER, W. W.; MILLER, W. A.; & LARGIER, J. L. Effect of estuarine wetland degradation on transport of *Toxoplasma gondii* surrogates from land to sea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p.6821–6828, 2010.

VIELLIARD, J. M. E. Bird community as an indicator of biodiversity: results from quantitative surveys in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 72, n. 3, Rio de Janeiro, 2000.

WILSON, A. G.; LAPEN, D. R.; MITCHELL, G. W.; PROVENCHER, J. F. & Wilson, S. Interaction of diet and habitat predicts *Toxoplasma gondii* infection rates in wild birds at a global scale. **Global Ecology and Biogeography**, v. 29, n. 7 , p.1189-1198, 2020.

WÜNSCHMANN, A.; REJMANEK, D.; CRUZ-MARTINEZ, L.; BARR B.C. *Sarcocystis falcatula* associated encephalitis in a free-ranging great horned owl (*Bubo virginianus*), **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, p. 283–287, 2009.

YAN, C.; LIANG, L. J.; ZHENG, K. Y.; ZHU, X. Q. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*, **Parasites & Vectors**, v.9, p.1-7, 2016.

2 CAPÍTULO I – OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii*, ANTI-*Neospora caninum* E ANTI-*Sarcocystis* spp. EM AVES SILVESTRES DA REGIÃO SUL DO BRASIL

RESUMO

Os protozoários *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp., infectam vários animais, inclusive as aves. São protozoários importantes tanto por questões econômicas, quanto saúde animal e humana. As aves se infectam pela ingestão de alimentos e água contaminados com esporocistos e oocistos esporulados, e por ingestão de cistos em tecidos infectados. Considerando a escassez de dados sobre a prevalência desses protozoários em aves silvestres, o objetivo do estudo foi verificar a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii*, anti-*N. caninum* e anti-*Sarcocystis* spp. em aves silvestres. No período de novembro de 2018 a dezembro de 2019, foram coletadas amostras de sangue de 38 aves de rapina, 52 psitacídeos e 42 aves marinhas. Das 132 aves, 52 eram de cativeiro provenientes do Zoológico de Curitiba e do Laboratório de criação e incubação de animais alternativos, silvestres e exóticos (LACRIAS – UFPR) que fica na região metropolitana de Curitiba. As outras 80 aves eram de vida livre, provenientes de resgate realizado pelo Instituto Água e Terra (IAT) na cidade de Curitiba e região metropolitana e pelo Projeto de monitoramento de praias – Bacia de Santos na orla do litoral do Paraná e Santa Catarina. As amostras foram coletadas e acondicionadas em tubos com anticoagulante heparina. O diagnóstico sorológico foi realizado pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Os plasmas foram diluídos em PBS (pH 7,2) no ponto de corte de 1:25 para os três protozoários. O conjugado anti-*chicken* foi utilizado na diluição de 1:50. Das 132 amostras analisadas, 3,78% (5/132) foram positivas para *T. gondii* e 12,1% (16/132) foram positivas para *Sarcocystis* spp. Não foram encontrados anticorpos anti-*N. caninum*. Anticorpos anti-*T. gondii* foram detectados em um gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*), um papagaio-chauá (*Amazona rhodocorytha*), um gaivotão (*Larus dominicanus*) e em dois pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*). Anticorpos anti-*Sarcocystis* spp. foram detectados em uma corujinha-do-sul (*Megascops sanctaecatarinae*), uma coruja-buraqueira (*Athene cunicularia*), um gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*), um carcará (*Caracara plancus*), um quiriquiri (*Falco sparverius*), uma ararajuba (*Guaruba guarouba*), uma arara-canindé (*Ara ararauna*), em cinco papagaios-chauá (*Amazona rhodocorytha*), uma fragata (*Fregata magnificens*), um atobá (*Sula leucogaster*) e em dois gaivotões (*Larus dominicanus*). Os resultados demonstram que as aves foram expostas aos protozoários *T. gondii* e *Sarcocystis* spp.

Palavras chaves: Rapinantes, toxoplasmose, aves marinhas, RIFI, protozoários.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp., infect several animals, including birds. These protozoans are important for economic reasons and for animal and human health. Birds become infected by ingestion of food and water contaminated with sporulated oocysts and sporocysts, and by ingestion of cysts in infected tissues. Considering the scarcity of data on the prevalence of these protozoa in wild birds, the aim of the study was to verify the occurrence of antibodies anti-*T. gondii*, anti-*N. caninum* and anti-*Sarcocystis* spp. in wild birds. From November 2018 to December 2019, blood samples were collected from 38 raptors, 52 parrots and 42 seabirds. Of the 132 birds, 52 were captive from the Zoologico Municipal de Curitiba and from the Laboratório de criação e incubação de animais alternativos, silvestres e exóticos (LACRIAS – UFPR) which is located in the metropolitan region of Curitiba. The 80 free-living birds, were from rescues carried out by the Água e Terra Institute (IAT) in the city of Curitiba and in the metropolitan region and by the Santos Basin Beach Monitoring Project on the coast of Paraná and Santa Catarina. Blood samples were collected and placed in tubes with heparin anticoagulant. The serological diagnosis was performed by the indirect immunofluorescence antibody test (IFAT). Plasma was diluted in PBS (pH 7.2) at the cutoff point of 1:25 for the three protozoa. The anti-chicken conjugate was used at a 1:50 dilution. Of the 132 samples analyzed, 3.78% (5/132) were positive for *T. gondii* and 12.1% (16/132) were positive for *Sarcocystis* spp. Antibodies to *N. caninum* were not found. Antibodies to *T. gondii* were detected in one roadside hawk (*Rupornis magnirostris*), one red-browed parrot (*Amazona rhodocorytha*), one kelp gull (*Larus dominicanus*) and in two Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). Antibodies to *Sarcocystis* spp. were detected in one long-tufted screech-owl (*Megascops sanctaecatarinae*), one burrowing owl (*Athene cunicularia*), one roadside hawk (*Rupornis magnirostris*), one crested caracara (*Caracara plancus*), one American kestrel (*Falco sparverius*), one golden parakeet (*Guaruba guarouba*), one blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*), five red-browed parrots (*Amazona rhodocorytha*), one magnificent frigatebird (*Fregata magnificens*), one brown booby (*Sula leucogaster*) and in two kelp gulls (*Larus dominicanus*). The results demonstrate that the birds were exposed to the protozoa *T. gondii* and *Sarcocystis* spp.

Key words: Raptors, toxoplasmosis, seabirds, IFAT, protozoa.

2.1 INTRODUÇÃO

Os protozoários *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis* spp. são parasitos heteróxeos obrigatórios do filo Apicomplexa, infectam várias espécies de animais domésticos e silvestres, incluindo as aves (TENTER *et al.*, 2000; PRAKAS *et al.*, 2012; DONAHOE *et al.*, 2015). As aves se infectam pela ingestão de alimentos e água contaminados com esporocistos e oocistos esporulados, e por meio da ingestão de cistos em tecidos infectados (DUBEY, 2002).

A toxoplasmose é uma doença zoonótica cosmopolita causada pelo protozoário *T. gondii*. Apresenta-se como infecção oportunista nos casos de imunossupressão e pode causar impactos econômicos na produção animal devido às perdas por morte e aborto (DUBEY, 2021). É uma doença importante na saúde pública no qual um terço da população é sorologicamente positiva (ALVARADO-ESQUIVEL *et al.*, 2014; AMOUIEI *et al.*, 2018). Os felinos domésticos e silvestres são os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, que eliminam os oocistos no ambiente servindo como fonte de infecção para outros animais e podem se infectar por meio da predação de hospedeiros intermediários como aves e roedores (TENTER *et al.*, 2000; DUBEY, 2021). Um único gato pode excretar milhões de oocistos que podem permanecer viáveis no ambiente por meses sob condições naturais (LOSS *et al.*, 2013; DUBEY, 2021).

As aves têm um papel significativo na epidemiologia da toxoplasmose e são consideradas importantes hospedeiras intermediárias deste protozoário porque além de servir como fonte de infecção para os felídeos, as espécies de aves que se alimentam no solo são consideradas sentinelas de contaminação ambiental com oocistos (LOSS *et al.*, 2013; GENNARI *et al.*, 2014; WILSON *et al.*, 2020). Estudos de ocorrência de *T. gondii* já foram feitos em aves das ordens Columbiformes, Passeriformes, Falconiformes, Accipitriformes, Gruiformes, Anseriformes e Psittaciformes e foram encontrados valores de ocorrência que variaram de 0 a 79% (CABEZÓN *et al.*, 2011; GAZONNIS *et al.*, 2018; KONELL *et al.*, 2019; DUBEY, 2021).

A neosporose é considerada uma das causas mais importantes de aborto em bovinos em todo o mundo e pode causar sinais clínicos neuromusculares em pequenos animais (DUBEY; SCHARES, 2011; CERQUEIRA-CÉZAR *et al.*, 2017). Os canídeos domésticos e algumas espécies de canídeos selvagens são os hospedeiros

definitivos de *N. caninum* e vários animais endotérmicos são os hospedeiros intermediários (MCALLISTER *et al.*, 1998; GONDIM *et al.*, 2004; DUBEY; SCHARES, 2011). *Neospora caninum* foi relatado em vários animais silvestres ao redor do mundo (DUBEY *et al.*, 2007; DUBEY; SCHARES, 2011) e ao longo dos anos, as aves têm sido investigadas como hospedeiras intermediárias de *N. caninum* (DONAHOE *et al.*, 2015; de BARROS *et al.*, 2018). Alguns estudos anteriores utilizando técnicas sorológicas e moleculares indicaram que algumas espécies de aves são hospedeiras intermediárias naturais de *N. caninum* (DARWICH *et al.*, 2012; de BARROS *et al.*, 2018; NARDONI *et al.*, 2019a) entretanto o papel das aves silvestres no ciclo do parasito ainda é incerto.

Os protozoários *Sarcocystis* são coccídeos intracelulares caracterizados por ciclo de vida heteroxeno envolvendo um hospedeiro definitivo e um hospedeiro intermediário (DUBEY, 2016). A multiplicação assexuada do parasito ocorre nos hospedeiros intermediários, geralmente onívoros, com formação de cistos na musculatura (ROSENTHAL, 2021). A fase sexual, com formação de oocistos/espocistos, ocorre no intestino delgado de hospedeiros definitivos, geralmente animais carnívoros predadores (PRAKAS *et al.*, 2012; DUBEY, 2016). Mais de 210 espécies de *Sarcocystis* foram identificadas, principalmente em mamíferos, entretanto o ciclo de vida completo é descrito para apenas 26 espécies (GONDIM *et al.*, 2021). Entre os *Sarcocystis* spp. que infectam mamíferos e aves, duas espécies utilizam gambás (*Didelphis* spp.) como hospedeiros definitivos, *Sarcocystis neurona* que causa meningoencefalite em cavalos (DUBEY *et al.*, 2015) e *Sarcocystis falcatula* que causa lesão pulmonar grave e encefalite em aves (GONDIM *et al.*, 2021). Surtos de sarcocistose causando a morte de várias aves, principalmente papagaios foram relatados em zoológicos nos Estados Unidos e no Brasil (GODOY *et al.*, 2014).

Considerando à escassez de informações sobre esses três protozoários Apicomplexa em aves silvestres, o objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii*, anti-*N. caninum* e anti-*Sarcocystis* spp. no plasma de aves silvestres.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Aves

No período de novembro de 2018 a dezembro de 2019 foram coletadas amostras de sangue de 132 aves silvestres. Das 132 aves, 52 eram mantidas sob cuidados humanos em cativeiro provenientes do Zoológico de Curitiba e do Laboratório de criação e incubação de animais alternativos, silvestres e exóticos (LACRIAS – UFPR) que fica na região metropolitana de Curitiba. As outras 80 aves eram de vida livre, provenientes de resgate realizado pelo Instituto Água e Terra (IAT) na cidade de Curitiba e região metropolitana e pelo Projeto de monitoramento de praias – Bacia de Santos (PMP-BS) na orla do litoral área Santa Catarina/Paraná (SC/PR). O resgate das aves marinhas feito pela equipe do (PMP-BS) foi conduzido na área (SC/PR), trecho 4, na orla do litoral que engloba os seguintes municípios: Barra Velha (26°37'56" S e 48°41'05" O), Piçarras (26°45'50" S e 48°40'18" O), Penha (26°46'10" S e 48°38'45" O), Navegantes (26°53'56" S e 48°39'15" O), Itajaí (26° 54' 28" S e 48° 39' 43" O), Balneário Camboriú (26° 59' 27" S e 48° 38' 06" O), Itapema (27°05'25" S e 48°36'41" O), Porto Belo (27°09'28" S e 48°33'11" O), Bombinhas (27°07'54" S e 48°31'40" O), Tijucas (27°14'29" S e 48°38'01" O), Governador Celso Ramos (27°18'53" S e 48°33'33" O) (Figura 1).

Figura 1: Mapa da área Santa Catarina/Paraná (SC/PR), trecho 4 na orla do litoral.



FONTE: O autor (2022)

2.2.2 Amostras

As amostras de sangue foram coletadas durante a rotina de exame clínico das aves por venopunção das veias metatársica medial, jugular e ou ulnar sendo o volume máximo coletado 1% do peso vivo da ave. As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos com anticoagulante heparina. A obtenção do plasma foi feita com a centrifugação da amostra por 3.745 g durante cinco minutos. Os plasmas foram armazenados a -20°C até a realização da reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

2.2.3 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A RIFI foi utilizada para avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii*, anti-*N. caninum* e anti-*Sarcocystis* spp. nas amostras de plasma conforme metodologia descrita por Locatelli-Dittrich *et al.*, (2006) e Konell *et al.*, (2019). As amostras de plasma foram diluídas em solução salina tamponada com solução fosfato (PBS - 0,1 M de fosfato, 0,33 M de NaCl, pH 7,2) e avaliadas em lâminas de RIFI contendo taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, cepa NC-1 de *N. caninum* e merozoítos da cepa SN37R de *S. neurona*. Os plasmas foram diluídos no ponto de corte de diluição 1:25 para *T. gondii*, *N. caninum* e *S. neurona* (KONELL *et al.*, 2019). Foi utilizado como anticorpo secundário o anticorpo Anti-Chicken IgY (IgG) conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (F4137 Sigma, EUA) na diluição de 1:50. Este conjugado apresenta reatividade cruzada e foi validado para a detecção de imunoglobulinas séricas em aves silvestres de diferentes espécies (CRAY; VILLAR, 2008). A leitura das lâminas foi feita em microscópio de imunofluorescência e em cada lâmina foi adicionado um controle positivo, uma amostra de soro de galinha que deu positivo exclusivamente para *T. gondii* e *N. caninum* e uma amostra de soro de um rapinante que reagiu apenas para *S. neurona*. O controle negativo consistia no soro de uma galinha previamente examinado e negativo para os três protozoários. As amostras positivas no nível de corte foram ainda tituladas para estabelecer o título final.

2.2.4 Análise estatística

O teste do Qui-quadrado foi usado para verificar a associação entre a procedência (vida livre e mantidas sob cuidados humanos) e a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii*, anti-*N. caninum* e anti- *Sarcocystis* spp. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$ para todas as análises (GraphPad Prism 9.4.1).

2.3 RESULTADOS

Foram estudadas 132 aves silvestres de 28 espécies, das seguintes ordens taxonômicas: Accipitriformes (n=5), Falconiformes (n=12), Strigiformes (n=20), Cathartiformes (n=1), Psittaciformes (n=52), Charadriiforme (n=21), Suliforme (n=3) Procellariiforme (n=1), e Sphenisciformes (n=17). Das 132 aves silvestres, 52 eram mantidas sob cuidados humanos em cativeiro (C) e 80 eram de vida livre (VL). As aves silvestres avaliadas no estudo estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Aves avaliadas na pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, anti-*N. caninum* e anti- *Sarcocystis* spp.

Nome comum	Nome científico	Ordem	Procedência	Total - n
Gavião-asa-de-telha	<i>P. uncinctus</i>	Accipitriformes	VL	1
Corujinha-do-mato	<i>M. choliba</i>	Strigiformes	VL	3
Carcará	<i>C. plancus</i>	Falconiformes	VL	5
Coruja-orelhuda	<i>A. clamator</i>	Strigiformes	VL	9
Quiriquiri	<i>F. sparverius</i>	Falconiformes	VL	3
Falcão-de-coleira	<i>F. femoralis</i>	Falconiformes	VL	1
Gavião-carrapateiro	<i>M. chimachima</i>	Falconiformes	VL	2
Falcão-peregrino	<i>F. peregrinus</i>	Falconiformes	VL	1
Coruja-buraqueira	<i>A. cunicularia</i>	Strigiformes	VL	4
Urubu-da-cabeça-preta	<i>C. atratus</i>	Cathartiformes	VL	1
Corujinha-do-sul	<i>M. sanctaecatarinae</i>	Strigiformes	VL	2
Gavião-carijó	<i>R. magnirostris</i>	Accipitriformes	VL	4
Suindara	<i>T. furcata</i>	Strigiformes	VL/C	2
Papagaio-do-peito-roxo	<i>A. vinacea</i>	Psittaciformes	C	1
Ararajuba	<i>G. guarouba</i>	Psittaciformes	C	2
Aracanga	<i>A. macao</i>	Psittaciformes	C	3
Papagaio-de-cara-roxa	<i>A. brasiliensis</i>	Psittaciformes	VL/C	2
Papagaio-chauá	<i>A. rhodocorytha</i>	Psittaciformes	C	8
Papagaio-verdadeiro	<i>A. aestiva</i>	Psittaciformes	C	8
Arara-canindé	<i>A. ararauna</i>	Psittaciformes	C	8
Periquito-de-colar	<i>P. krameri</i>	Psittaciformes	C	20
Trinta-réis-de-bico-vermelho	<i>S. hirundinacea</i>	Charadriiforme	VL	3
Fragata	<i>F. magnificens</i>	Suliforme	VL	2
Atobá-pardo	<i>S. leucogaster</i>	Suliforme	VL	1
Gaivotão	<i>L. dominicanus</i>	Charadriiforme	VL	17
Pardela -preta	<i>P. aequinoctialis</i>	Procellariiforme	VL	1
Pinguim-de-magalhães	<i>S. magellanicus</i>	Sphenisciformes	VL	17
Moleiro	<i>S. pomarinus.</i>	Charadriiforme	VL	1

n= número total de indivíduos da espécie. VL: Vida livre C: Cativeiro

Das 132 amostras analisadas na RIFI, 3,78% (5/132) foram positivas para *T. gondii* e 12,1% (16/132) foram positivas para *Sarcocystis* spp. Não foram encontrados anticorpos anti-*N. caninum*. Considerando a ordem taxonômica, anticorpos para *T. gondii* foram detectados em aves das ordens Accipitriformes, Psittaciformes, Charadriiforme e Sphenisciformes. Anticorpos para *Sarcocystis* spp. foram detectados em aves das ordens Falconiformes, Strigiformes, Psittaciformes, Suliformes e Charadriiformes. A ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Sarcocystis* spp. em aves silvestres de nove ordens taxonômicas está descrita na tabela 2.

Tabela 2: Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Sarcocystis* spp. em aves silvestres de nove ordens taxonômicas.

Ordem taxonômica	<i>T. gondii</i>	<i>Sarcocystis</i> spp.
Accipitriformes (n= 5)	20% (1/5)	20% (1/5)
Falconiformes (n= 12)	0	16,6% (2/12)
Strigiformes (n=20)	0	10% (2/20)
Cathartiformes (n=1)	0	0
Psittaciformes (n= 52)	1,92% (1/52)	13,4% (7/52)
Suliformes (n= 3)	0	66,6% (2/3)
Charadriiforme (n= 21)	4,76% (1/21)	9,52% (2/21)
Procellariiforme (n=1)	0	0
Sphenisciformes (n=17)	11,7% (2/17)	0
Total (n= 132)	3,78% (5/132)	12,1% (16/132)

n= número total de aves.

Anticorpos anti-*T. gondii* foram detectados em um gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*), um papagaio-chauá (*Amazona rhodocorytha*), um gaivotão (*Larus dominicanus*) e em dois pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*). Anticorpos anti-*Sarcocystis* spp. foram detectados em uma corujinha-do-sul (*Megascops sanctaecatarinae*), uma coruja-buraqueira (*Athene cunicularia*), um gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*), um carcará (*Caracara plancus*), um quiriquirei (*Falco sparverius*), uma ararajuba (*Guaruba guarouba*), uma arara-canindé (*Ara ararauna*), em cinco papagaios-chauá (*Amazona rhodocorytha*), uma fragata (*Fregata magnificens*), um atobá (*Sula leucogaster*) e em dois gaivotões (*Larus dominicanus*). Os títulos dos anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*Sarcocystis* spp. nas amostras soropositivas variaram de 25 a 100. Os títulos de anticorpos das aves silvestres positivas para *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Títulos de anticorpos das aves silvestres positivas para *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis* spp.

Nome comum (nome científico)	Titulação	
	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Sarcocystis</i> spp.
Gavião-carijó (<i>Rupornis magnirostris</i>)	50	-
Pinguins-de-magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	50	-
Pinguins-de-magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	50	-
Gaivotão (<i>Larus dominicanus</i>)	25	-
Papagaio-chauá (<i>Amazona rhodocorytha</i>)	25	-
Quiriquiri (<i>Falco sparverius</i>)	-	100
Corujinha-do-sul (<i>Megascops sanctaecatarinae</i>)	-	50
Arara-canindé (<i>Ara ararauna</i>)	-	50
Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	-	25
Gavião-carijó (<i>Rupornis magnirostris</i>)	-	25
Carcará (<i>Caracara plancus</i>)	-	25
Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>)	-	25
Papagaio-chauá (<i>Amazona rhodocorytha</i>)	-	25
Papagaio-chauá (<i>Amazona rhodocorytha</i>)	-	25
Papagaio-chauá (<i>Amazona rhodocorytha</i>)	-	25
Papagaio-chauá (<i>Amazona rhodocorytha</i>)	-	25
Papagaio-chauá (<i>Amazona rhodocorytha</i>)	-	25
Fragata (<i>Fregata magnificens</i>)	-	25
Atobá (<i>Sula leucogaster</i>)	-	25
Gaivotão (<i>Larus dominicanus</i>)	-	25
Gaivotão (<i>Larus dominicanus</i>)	-	25

(-) = reação negativa.

A detecção de anticorpos para *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. foi maior em aves de vida livre do que em aves mantidas sob cuidados humanos em cativeiro, embora a procedência não foi significativa para a ocorrência de *T. gondii* ($X^2=0,8187$; $P=0,3656$) e nem *Sarcocystis* spp. ($X^2=0,1447$; $P=0,7036$). A análise estatística de associação entre a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*Sarcocystis* spp. e a procedência das aves (vida livre e cativeiro) está descrita na tabela 4.

Tabela 4: Análise estatística de associação entre a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*Sarcocystis* spp. e a procedência das aves.

Categoria	Variável	RIFI <i>T. gondii</i>			RIFI <i>Sarcocystis</i> spp.		
		Negativo	Positivo	<i>P</i>	Negativo	Positivo	<i>P</i>
Procedência	C	51 (98,07%)	1 (1,92%)	0,365	45 (86,54%)	7 (13,46%)	0,703
	VD	76 (95%)	4 (5%)		71 (88,75%)	9 (11,25%)	

VL= Vida livre, C= cativeiro

2.4 DISCUSSÃO

Das 132 amostras analisadas na RIFI, 3,78% (5/132) foram positivas para *T. gondii* e 12,1% (16/132) para *Sarcocystis* spp. demonstrando que as aves foram expostas aos protozoários.

No presente estudo, 3,78% das aves silvestres das seguintes espécies gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*), papagaio-chauá (*Amazona rhodocorytha*), gaivotão (*Larus dominicanus*) e pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*, demonstrando uma maior ocorrência de anticorpos em aves carnívoras.

No Brasil, testes sorológicos têm sido empregados para detectar anticorpos para *T. gondii* em aves silvestres, mas poucos estudos foram realizados em psitacídeos, rapinantes e aves marinhas de vida livre. Esses poucos estudos relataram principalmente achados de anticorpos de *T. gondii* usando o teste de aglutinação modificado (MAT) (MARIETTO-GONÇALVES *et al.*, 2013; GENNARI *et al.*, 2014; GENNARI *et al.*, 2016), ensaio de hemaglutinação indireta (IHA) (MOREL *et al.*, 2020) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (SATO *et al.*, 2020) com a soroprevalência variando de 0 a 69,4%.

Apenas uma ave de rapina, um gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*) foi positiva para *T. gondii*, um valor inferior quando comparado ao estudo de Sato *et al.*, (2021) onde a prevalência encontrada foi de 8.3% (6/72) em quatro espécies de rapinantes de cativeiro e ao estudo de Gazzonis *et al.*, (2018), no qual verificaram uma prevalência de 11,5% nas aves da família Accipitridae. A baixa prevalência de anticorpos anti-*T. gondii*, em alguns estudos soropidemiológicos de aves silvestres pode ser atribuída a vários fatores como idade das aves, ambiente onde vivem, dieta, comportamento e o teste sorológico empregado (CASARTELLI-ALVES *et al.*, 2014; DUBEY, 2021).

A baixa prevalência de anticorpos *anti-T. gondii* em aves de rapina pode estar associada à cinética de anticorpos IgY (IgG) no momento da coleta da amostra. Um estudo experimental em carcarás (*Caracara plancus*) verificou que a cinética de anticorpos IgY (IgG) específicos para *T. gondii* foi homogênea no grupo infectado, com soroconversão em torno de 10 dias pós-infecção (dpi) com pico de produção de IgY (IgG) entre 15 e 30 dpi e uma tendência posterior para uma diminuição na concentração de anticorpos, com títulos baixos ou ausentes (VITALIANO *et al.*, 2010).

A prevalência de *T. gondii* em aves carnívoras reflete a prevalência do parasita em suas presas (DUBEY, 2021). O gavião-carijó tem hábito alimentar generalista com alimentação variada pois consome desde pequenos mamíferos e insetos até aves e lagartos (PENASCI; WHITACRE, 2000; BALADRÓN *et al.*, 2011). Sato *et al.*, (2021)

verificaram que a soropositividade para *T. gondii* foi significativa entre aves de rapina mantidas para falcoaria e alimentadas com pequenas aves principalmente codornas.

Foi verificada a ocorrência de anticorpos anti- *T. gondii* em um papagaio-chauá (*Amazona rhodocorytha*) de cativeiro. Estudos soroepidemiológicos em psitacídeos de cativeiro e vida livre são escassos e a soroprevalência varia de 0 a 25%. Zhang *et al.*, (2014) avaliaram 311 psitacídeos criados como *pets* na China e encontraram anticorpos anti-*T. gondii* em 8,36%. Sato *et al.*, (2020) avaliaram amostras de plasma de 51 papagaios-da-cara-roxa e não encontraram anticorpos.

No presente estudo, dois pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) e um gaivotão (*Larus dominicanus*) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*. Outros estudos com aves marinhas no Brasil observaram uma maior soroprevalência. Gennari *et al.*, 2016 estudando 69 aves marinhas do arquipélago de Abrolhos, verificaram a ocorrência de anticorpos para *T. gondii* usando MAT em 34,8% das 69 aves. Acosta *et al.*, (2019) verificaram uma soroprevalência de *T. gondii* em pinguins-de-magalhães de 43,1%. A ocorrência de aves marinhas positivas para *T. gondii* sugere que as aves podem ter se contaminado por ingestão de oocistos esporulados no ambiente marinho e ou ingestão de bradizoítos em cistos teciduais (CABEZÓN *et al.*, 2016). Estudos recentes demonstraram que a poluição antropogênica da linha costeira com esgoto ou escoamento superficial de água doce contaminada com oocistos de *T. gondii* é um fator chave na epidemiologia da toxoplasmose no ambiente marinho (SHAPIRO *et al.*, 2019). Estes oocistos podem permanecer infectantes por até 24 meses e em ecossistemas aquáticos os mesmos podem ser acumulados por filtração de moluscos bivalves (LINDSAY *et al.*, 2004) ou filtração de peixes (MASSIE *et al.*, 2010) e isso tem sido sugerido como uma rota de transmissão, uma vez que os moluscos e os peixes são fonte de alimento de mamíferos e aves marinhas.

Das 132 aves silvestres estudadas, 12,1% mostraram reatividade ao antígeno de *S. neurona* na RIFI. É importante enfatizar que a utilização do antígeno de *S. neurona* provavelmente detecta anticorpos contra outras espécies de *Sarcocystis*, além de *S. neurona*. A RIFI para *S. neurona* foi desenvolvida utilizando merozoítos derivados de cultivo de células inteiras e permitiu a detecção de anticorpos para antígenos de superfície de *S. neurona*, mas alguns desses antígenos provavelmente são compartilhados entre diferentes espécies do gênero *Sarcocystis* (DUBEY *et al.*, 2016). Outros estudos em aves no Brasil que utilizaram RIFI para avaliar a

soroatividade ao antígeno de *S. neurona* encontraram valores que variaram de 0 a 28.1% (KONELL *et al.*, 2019; SATO *et al.*, 2020).

Cinco espécies de rapinantes foram positivas no estudo, corujinha-do-sul (*Megascops sanctaecatarinae*), coruja-buraqueira (*Athene cunicularia*), gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*), carcará (*Caracara plancus*) e quiriquirei (*Falco sparverius*). As aves de rapina podem ser hospedeiras intermediárias de algumas espécies de *Sarcocystis* e são suscetíveis à infecção (DUBEY, 2016).

Estudos soroepidemiológicos para verificar a ocorrência de anticorpos anti *Sarcocystis* spp. em aves silvestres são escassos. Um estudo investigando 72 aves de rapina, detectou anticorpos anti-*Sarcocystis* spp. em 11.1% (8/72) (SATO *et al.*, 2020). O diagnóstico de sarcocistose em aves silvestres geralmente é feito com o exame histopatológico e análise molecular para identificação da espécie. Von Dohlen *et al.*, (2019), verificaram amostras de tecidos do músculo peitoral e cardíaco de 204 rapinantes, e encontraram *Sarcocystis* spp. em 39 (19,1%) das amostras testadas. A espécie *S. falcatula* foi relatada como causa de encefalite em coruja-jacurutu (*Bubo virginianus*) (WÜNSCHMANN *et al.*, 2009), águia-americana (*Haliaeetus leucocephalus*) e em águia-real (*Aquila chrysaetos*) (WÜNSCHMANN *et al.*, 2010). No Brasil, existem poucos estudos moleculares sobre identificação de *Sarcocystis* spp. em aves de rapina. Recentemente, Llano *et al.*, (2022), investigando por meio da análise molecular de amostras de tecido (musculatura peitoral) reportaram duas espécies de *Sarcocystis* em rapinantes, *S. falcatula* e *S. halioti*.

No presente estudo anticorpos anti-*Sarcocystis* spp. foram detectados em sete psitacídeos. No estudo de Cray *et al.*, (2005) amostras de plasma de 16 psitacídeos foram testadas utilizando o método de RIFI, e dez psitacídeos apresentaram anticorpos anti-*Sarcocystis falcatula*. Neste estudo todas as 16 aves testadas tiveram diagnóstico de sarcocistose confirmada por exame histopatológico. Estes autores também verificaram que muitas aves morreram antes de produzir anticorpos contra o protozoário, demonstrando como alguns psitacídeos, principalmente espécies do velho mundo são mais susceptíveis a infecção por *S. falcatula* (GODOY *et al.*, 2009).

No presente estudo, foi detectado anticorpos anti-*Sarcocystis* spp. em uma fragata (*Fregata magnificens*), um atobá (*Sula leucogaster*) e em dois gaivotões (*Larus dominicanus*), sugerindo que as aves marinhas foram expostas ao protozoário. Não existe estudos sorológicos sobre a ocorrência de anticorpos anti-*Sarcocystis* spp. em

aves marinhas, apenas estudos moleculares. Na Europa, DNA do parasito foi detectado na musculatura do corvo-marinho-de-faces-brancas (*Phalacrocorax carbo*) (PRAKAS *et al.*, 2018) e em gaivota-argêntea (*Larus argentatus*) (PRAKAS *et al.*, 2020). No sul do Chile uma espécie de *Sarcocystis* relacionado ao DNA de *S. halioti* foi identificado em mandrião-chileno (*Stercorarius chilensis*) (ACOSTA *et al.*, 2021) e recentemente Sato *et al.* (2022) no Brasil identificaram *S. falcatula* e *S. halioti* em gaivotões (*Larus dominicanus*), atóbas (*Sula leucogaster*), em biguás (*Phalacrocorax brasilianus*), em mandrião-grande (*Stercorarius skua*) e em bobo-pequeno (*Puffinus puffinus*).

Entre *Sarcocystis* spp. que infectam mamíferos e aves, duas espécies utilizam gambás (*Didelphis* spp.) como hospedeiros definitivos, *S. neurona* que causa meningoencefalite em cavalos (DUBEY *et al.*, 2015) e *S. falcatula* que causa lesão pulmonar grave e encefalite em aves (GODOY *et al.*, 2014; GONDIM *et al.*, 2021). Até o momento, não há evidências de *S. neurona* em rapinantes, aves marinhas e psitacídeos. Pode-se supor que a reatividade cruzada entre os antígenos de merozoítos de *S. neurona* e *S. falcatula* tenha ocorrido (GONDIM *et al.*, 2017; GONDIM *et al.*, 2021). Pouco se sabe sobre a reatividade cruzada entre *Sarcocystis* spp. excretados por *Didelphis* spp., ou entre outras espécies de *Sarcocystis* (DUBEY *et al.*, 2001; GONDIM *et al.*, 2021) mas estudos recentes demonstraram que a reatividade cruzada pode ocorrer entre *S. neurona* e *S. falcatula* (de JESUS *et al.*, 2019).

Não foram encontrados anticorpos anti-*N. caninum* nas aves do estudo. Mineo *et al.*, (2011), investigaram a ocorrência de *N. caninum* em 294 aves silvestres, sendo 102 psitacídeos adultos criados em cativeiro também não detectaram anticorpos anti-*N. caninum* em nenhuma das aves. Dados na literatura sobre a ocorrência de *N. caninum* em aves silvestres, demonstraram variações nos valores de ocorrência que variaram de 0% a 34% entre as espécies, onde aves aquáticas demonstraram maior soroprevalência (NARDONI *et al.*, 2019) e psitacídeos e gansos uma menor soroprevalência (MINEO *et al.*, 2011; KONELL *et al.*, 2019). Estudos sugerem que a suscetibilidade à infecção por *N. caninum* em aves pode ser espécie-específica onde as aves de rapina parecem ser mais resistentes, enquanto os passeriformes, pombos e aves aquáticas parecem ser mais suscetíveis à infecção (ROCHICHIANNI *et al.*, 2017; de BARROS *et al.*, 2018).

2.5 CONCLUSÃO

As aves de rapina, os psitacédeos e as aves marinhas foram expostas aos protozoários *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. Novos estudos são necessários para verificar o papel dessas aves na epidemiologia destes protozoários e a importância desta interação na conservação das espécies.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, I.C.L.; SOUZA-FILHO, A.F.; MUÑOZ-LEAL, S.; SOARES, H.S.; HEINEMANN, M.B.; MORENO, L.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; GENNARI, S.M. Evaluation of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) on Magdalena Island, Chile. **Veterinary Parasitology Regional Studies and Reports**, v.16, p. 100282, 2019.
- ACOSTA, I.C.L.; GENNARI, S.M.; LLANO, H.A.B.; MUÑOZ-LEAL, S.; SOARES, R.M. Molecular Characterization of New Haplotype of Genus *Sarcocystis* in Seabirds from Magdalena Island, Southern Chile. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 245, 2021.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; PACHECO-VEGA, S. J.; HERNÁNDEZ-TINOCO, J.; SÁNCHEZ-ANGUIANO, L. F.; BERUMEN-SEGOVIA, L. O.; RODRÍGUEZ-ACEVEDO, F.J. I.; GÜERECÁ-GARCÍA, O. A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection and associated risk factors in Huicholes in Mexico. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2014.
- AMOUEI, A.; SHARIF, M.; HOSSEINI, S. A.; SARVI, S.; MIZANI, A.; SALEHI, S.; DARYANI, A. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic and migrating birds from Mazandaran province, Northern Iran. **Avian Biology Research**, v.11, n.1, p.12-15, 2018.
- BALADRÓN AV, BÓ MS, MALIZIA AI, BECHARD MJ. Food habits of the Roadside Hawk (*Buteo magnirostris*) during the nonbreeding season in the Southeastern Pampas of Argentina. **Journal Raptor Research**, v.45 p. 257-261, 2011.
- CABEZÓN, O.; GARCIA-BOCANEGRA, I.; MOLINA-LÓPEZ, R.; MARCO I.; BLANCO, J.M.; HOFLE, U.; MARGALIDA, A.; BACH-RAICH, E.; DARWICH, L.; ECHEVERRÍA, I.; OBÓN, E.; HERNÁNDEZ, M.; LAVIN, S.; DUBEY, J.P.; ALMERÍA, S. Seropositivity and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in wild birds from Spain, **Plos One**, v.6, n.12, 2011.
- CABEZÓN, O.; CERDÀ-CUÉLLAR, M.; MORERA, V.; GARCÍA-BOCANEGRA, I.; GONZÁLEZ-SOLÍS J.; NAPP, S.; RIBAS, M. P.; BLANCH-LÁZARO, B.; FERNÁNDEZ-AGUILAR, X; ANTILLES, N.; LÓPEZ-SORIA S.; LORCA-ORÓ, C.; DUBEY, J. P.; ALMERÍA S. *Toxoplasma gondii* infection in seagull chicks is related to the consumption of freshwater food resources. **Plo One**, v. 11 n. 3, p. 1–11, 2016.

CASARTELLI-ALVES, L.; BOECHAT, V.C.; MACEDO-COUTO, R.; FERREIRA, L.C.; NICOLAU, J.L.; NEVES, L.B.; MILLAR, P.R.; VICENTE, R.T.; OLIVEIRA, R.V.; MUNIZ, A.G.; BONNA, I.C.; AMENDOEIRA, M.R.; SILVA, R.C.; LANGONI, H.; SCHUBACH, T.M.; MENEZES, R.C. Sensitivity and specificity of serological tests, histopathology and immunohistochemistry for detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic chickens. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 346-351, 2014.

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

CRAY, C.; VILLAR, D. Cross-reactivity of anti-chicken IgY antibody with immunoglobulins of exotic avian species. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 37, n. 3, p. 328-331, 2008.

CERQUEIRA-CÉZAR, C.K.; CALERO-BERNAL, R.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; All about neosporosis in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.26, n. 3, p.253-279, 2017.

DARWICH, L.; CABEZÓN, O.; ECHEVERRIA, I.; PABÓN, M.; MARCO, I.; MOLINA-LOPEZ, R.; ALARCIA-ALEJOSE, O.; LOPEZ-GATIUS, F.; LAVINC, S.; ALMERIA, S. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 183 p.377– 381, 2012.

de BARROS, L.D.; MIURA, A.C.; MINUTTI, A.F.; VIDOTTO O.; GARCIA J.L., *Neospora caninum* in birds: A review. **Parasitology International**, v. 67 p.397–402, 2018.

de JESUS, R.F.; BORGES-SILVA, W.; BEZERRA, T.L.; GONDIM, L.Q.; UZÊDA, R.S.; GONDIM, L.F.P. Serologic cross-reactivity between *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula*-like in experimentally infected Mongolian gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 276, p. 108962, 2019.

DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S.A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, p. 216–238, 2015.

DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 121–153, 2002.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p.323-367, 2007.

DUBEY, J.P.; GARNER; M.M.; STETTER, M.D.; MARSH, A.E.; BARR, B.C. Acute *Sarcocystis falcatula*-like infection in a carmine bee-eater (*Merops nubicus*) and immunohistochemical cross reactivity between *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis*

neurona, **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 824–832, 2001.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animal – the last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J.P.; HOWE, D.K.; FURR, M.; SAVILLE, W.J.; MARSH, A.E.; REED, A.M.; GRIGG, M.E. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 209, n.1-2, p.1-42, 2015.

DUBEY, J.P.; CALERO-BERNAL, R.; ROSENTHAL, B.M.; SPEER, C.A.; **Sarcocystosis of animals and humans**, CRC Press, 2 ed. 2016.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of animals and humans** CRC Press 3 ed, p. 1-353. 2021.

GAZZONIS, A.L.; ZANZANI, S.A.; SANTORO, A.; VERONESI, F.; OLIVIERI, E.; VILLA, L.; LUBIAN, E.; LOVATI, S.; BOTTURA, F.; EPIS, S.; MANFREDI, M.T.; *Toxoplasma gondii* infection in raptors from Italy: seroepidemiology and risk factors analysis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 60, p. 42-45, 2018.

GENNARI, S.M.; OGRZEWALSKA, M.; SOARES, H.S.; SARAIVA, D.G.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B.; DUBEY, J.P. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in birds from the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.200, p.193-197, 2014.

GENNARI, S. M., NIEMEYER, C., SOARES, H. S., MUSSO, C. M., SIQUEIRA, G. C. C., CATÃO-DIAS, J. L., DIAS, R. A., & DUBEY, J. P., Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in seabirds from Abrolhos. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 50-52, 2016.

GODOY, S.N.; DE PAULA, C.D.; CUBAS, Z.S.; MATUSHIMA, E.R. Occurrence of *Sarcocystis falcatula* in Captive Psittacine Birds in Brazil. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, p. 18–23, 2009.

GODOY, S.N.; CESAR, M.O.; MATUSHIMA, E.R. Sarcosporidiose. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. 2 ed, São Paulo: ROCA, vol. 2, p. 1444-1449, 2014.

GONDIM, L.F.P.; MCALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*, **International Journal for Parasitology**, v. 34 p.159–161, 2004.

GONDIM, L.F.P.; MINEO, J.R.; SCHARES, G. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp. and *Besnoitia besnoiti*. **Parasitology**, v. 144, n. 7, p. 851-868, 2017.

GONDIM, L. F. P.; SOARES, R. M.; MORÉ, G.; JESUS, R. F. D.; LLANO, H. A. B. *Sarcocystis neurona* and related *Sarcocystis* spp. shed by opossums (*Didelphis* spp.) in South America. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.30, 2021.

KONELL, A. L., SATO, A.P., MALAGUINI, N.P. dos ANJOS A, FERREIRA, R.F., LOCATELLI-DITTRICH R. Serosurvey of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* in geese (*Anser* sp.) from urban parks and captivity. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28(2) p. 221-228, 2019.

LLANO, H.A.B.; POLATO, H. Z.; KEID, L.B.; de SOUZA OLIVEIRA, T. M. F.; Zwarg, T.; de OLIVEIRA, A. S., SANCHES, T. C.; JOPPERT, A. M.; GONDIM, L.F.P.; SOARES, R. M. Molecular screening for Sarcocystidae in muscles of wild birds from Brazil suggest a plethora of intermediate hosts for *Sarcocystis falcatula* **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 17, p. 230-238, 2022.

LINDSAY, D.S.; COLLINS, M.V.; MITCHELL, S.M.; WETECH, C.N.; ROSYPAL, A.C.; FLICK, G.J.; ZAJAC, A.M.; LINDQUIST, A.; DUBEY, J.P. Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Parasitology**, v.90, p.1054–1057, 2004.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; DITTRICH, J.R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO JOINEAU, M.E.; ANTUNES, J.; PINCKNEY, R.D.; DECONTO, I.; HOFFMANN, D.C.S.; THOMAZ SOCCOL, V. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.135, p. 215–221, 2006.

LOSS, S. R.; WILL, T.; MARRA, P. P. The impact of free-ranging domestic cats on wildlife of the United States. **Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2013.

MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28 p. 1473–1478, 1998.

MARIETTO-GONÇALVES, G.A.; ALMEIDA, S.M.; CAMOSSO, L.G.; LANGONI, H.; FILHO, R.L.A. Avaliação sorológica de Parainfluenzavirus Tipo 1, *Salmonella* spp., *Mycoplasma* spp. e *Toxoplasma gondii* em aves silvestres. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, p.473-480, 2013.

MARINO, A.M.F.; GIUNTA, R.P.; SALVAGGIO, A.; CASTELLO, A.; ALFONZETTI, T.; BARBAGALLO, A.; APARO, A.; SCALZO, F.; REALE, S.; BUFFOLANO, W.; PERCIPALLE, M. *Toxoplasma gondii* in edible fishes captured in the Mediterranean basin. **Zoonoses Public Health**, v. 66, p. 826–834, 2019.

MASSIE, G.N.; WARE, M.W.; VILLEGAS, E.N.; BLACK, M.W. Uptake and transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by migratory filter-feeding fish. **Veterinary Parasitology**, v.169, 296–303, 2010.

MINEO, T. W.; CARRASCO, A. O.; RASO, T. F.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2-4, p. 352-355, 2011.

MOREL, A.P.; WEBSTER, A.; RECK, J., Serosurvey of *Toxoplasma gondii* (eucoccidiorida: sarcocystidae) in southern caracaras (*Caracara plancus*), Rio Grande do Sul, Brazil, **Journal of Raptor Research**, v. 54 p. 81–83, 2020.

NARDONI, S.; POLI, A.; VARVARO, I.; ROCCHIGIANI, G.; CECCHERELLI, R.; MANCIANTI, F. Detection of *Neospora caninum* DNA in wild birds from Italy. **Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 1–6, 2019a.

PANASCI T.; WHITACRE D. Diet and foraging behavior of nesting Roadside Hawks in Petén, Guatemala. **Wilson Bulletin**, v. 112 p.555-558, 2000.

PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. **Ekologija**, v. 58, p. 45-58, 2012.

PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D.; ŠVAŽAS, S.; STANEVIČIUS, V. Morphological and genetic characterisation of *Sarcocystis halleti* from the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), **Parasitology Research** v.117 p. 3663–3667, 2018.

PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS D.; JUOZAITYTĖ-NGUGU, E. Molecular identification of four *Sarcocystis* species in the herring gull, *Larus argentatus*, from Lithuania, **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2020.

ROSENTHAL, B. M. Zoonotic sarcocystis. **Research in Veterinary Science**, v.136, p. 151-157, 2021.

SATO, A.P.; VAZ, F.F.; KONELL, A. L.; KOCH, M. O.; FERREIRA, R. F. SIPINSKI, E. A. B.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Survey of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* antibodies in wild red-tailed Amazon parrots (*Amazona brasiliensis*), **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, p. e017519, 2020.

SATO, A.P.; GOULART, M.A.; KONELL, A.L.; KOCH, M.O.; FONSECA, F.M.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Serosurvey of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* sp. in captive raptors and risk factors analysis. **Parasitology International**, v. 82, p. 102312, 2021.

SATO, A P.; SILVA, T.C.E.; PONTES, T.P.; SANCHES, A.W.D.; PRAKAS, P.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Molecular characterization of *Sarcocystis* spp. in seabirds from southern Brazil. **Parasitology International**, v. 90, p. 102595, 2022.

SHAPIRO, K.; BAHIA-OLIVEIRA, L.; DIXON, B.; DUMÈTRE, A.; DE WIT, L. A.; VANWORMER, E.; VILLENA, I. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 15, p. e00049, 2019.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii* from: animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, 1217-1258, 2000.

VON DOHLEN A. R.; SCOTT, D.; DUBEY J. P.; LINDSAY D. S. Prevalence of *Sarcocysts* in the muscles of raptors from a rehabilitation center in North Carolina, **Journal of Parasitology**, v.105 p. 11-16, 2019.

WILSON, A. G.; LAPEN, D. R.; MITCHELL, G. W.; PROVENCHER, J. F.; WILSON, S. Interaction of diet and habitat predicts *Toxoplasma gondii* infection rates in wild birds at a global scale. **Global Ecology and Biogeography**, v. 29, n. 7, p.1189-1198, 2020.

WÜNSCHMANN, A.; REJMANEK, D.; CRUZ-MARTINEZ, L.; BARR B.C.; *Sarcocystis falcatula* associated encephalitis in a free-ranging great horned owl (*Bubo virginianus*), **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 21p. 283–287. 2009.

WÜNSCHMANN, A.; REJMANEK, D.; CONRAD, P.A.; HALL, N.; CRUZ-MARTINEZ, L.; VAUGHN, S.B.; BARRET, B. C. Natural Fatal *Sarcocystis Falcatula* Infections in Free-Ranging Eagles in North America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n.2, p. 282-289, 2010.

ZHANG, X.; ZHANG, N.; TIAN, W.; ZHOU, D.; XU, Y.; ZHU, X. First report of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in pet parrots in China. **Vector-borne and Zoonotic disease**, v.14, p.394-398, 2014.

3 CAPÍTULO II - MOLECULAR DETECTION OF *Toxoplasma gondii* AND *Neospora caninum* IN SEABIRDS FROM SOUTHERN BRAZIL

ABSTRACT

Seabirds are predatory birds and ecological sentinels for environmental health. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* are two closely related protozoans with felids and canids as definitive hosts respectively. These hosts shed the protozoan oocysts in their feces. Birds can be infected by ingesting food and water contaminated with sporulated oocysts and by eating cysts in infected tissues. The aim of this study was to evaluate the presence of *T. gondii* and *N. caninum* DNA in tissue samples of 47 seabirds. From August 2019 to March 2020, tissue samples (pectoral muscles, heart, and brain) were collected from 47 dead seabirds from the coastline of Santa Catarina State, SC – Brazil. The DNA was extracted from the tissues and screened using nested-PCR targeting ITS1. The chi-square test was used to verify the association between birds positive in the n(PCR) for *T. gondii* and *N. caninum* and the variables (age and sex). *T. gondii* DNA was detected in tissues from seven seabirds (14.8%) of two species, kelp gull (*Larus dominicanus*) and manx shearwater (*Puffinus puffinus*). *N. caninum* DNA was detected in tissues of eight seabirds (17%) of five species, kelp gull (*Larus dominicanus*), manx shearwater (*Puffinus puffinus*), neotropic cormorant (*Phalacrocorax brasilianus*), brown booby (*Sula leucogaster*) and white-chinned petrel (*Procellaria aequinoctialis*). There were no statistically significant associations ($p \leq 0,05$) between seabirds positive on nPCR for *T. gondii* and/ or *N. caninum* and age and sex. . This study provides important information regarding the molecular detection of *T. gondii* and *N. caninum* in seabirds. Further studies are necessary to clarify the role of these birds in the life cycle of these protozoa.

Key words: Apicomplexa, gulls, marine environment, toxoplasmosis, ITS1.

3.1 INTRODUCTION

Seabirds are widely distributed around the world and comprise a diverse group of species that have adapted to the marine environment, including coastal areas, estuaries, islands, and coastal wetlands (PETRY *et al.*, 2012; VOTIER; SHERLEY, 2017).

The Apicomplexa protozoans, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* are two closely related coccidian parasites that form cysts and are linked to diseases of importance in humans and animals (DUBEY, 2021; DONAHOE *et al.*, 2015). Birds can be infected by consuming food and water contaminated with sporulated oocysts of *T. gondii*, and/ or *N. caninum* and by eating cysts from infected tissues (de BARROS *et al.*, 2018).

Toxoplasmosis, a common parasitic zoonotic disease, is caused by *T. gondii*. Felids are the definitive hosts of this parasite, shedding oocysts into the environment and serving as a source of infection for other animals (TENTER *et al.*, 2000; DUBEY, 2010). Birds are important intermediate hosts of this protozoan and can act as a source of infection for other animals that consume them (CABEZÓN *et al.*, 2011).

Considered a waterborne parasite, *T. gondii* has been recognized as a threat to some species of marine mammals in North America, such as sea otters, dolphins, and whales (JONES; DUBEY, 2009; SHAPIRO *et al.*, 2019). Studies of marine mammals have shown that oocysts in the environment play an important role in the epidemiology of this zoonotic protozoan (CABEZÓN *et al.*, 2016; DUBEY *et al.*, 2020). Furthermore, molecular epidemiology surveys revealed that freshwater could carry *T. gondii* oocysts from terrestrial to coastal marine habitats (VANWORMER *et al.*, 2015). Felids are terrestrial animals and deposit oocysts in the soil. The sporulated oocysts can be transported to fresh and marine waters via sewage or stormwater drainage systems and freshwater runoff (CONRAD *et al.*, 2009).

Neosporosis is a infectious disease caused by the obligate intracellular Apicomplexan parasite *Neospora caninum*. The disease is recognized as one of the major causes of bovine abortion worldwide (DONAHOE *et al.*, 2015; de BARROS *et al.*, 2018). The domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) and some species of wild canids as the Australian dingo (*Canis lupus dingo*), the coyote (*Canis latrans*) and the gray wolf (*Canis lupus*) are the definitive hosts for this parasite (MCALLISTER *et al.*, 1998; KINGS *et al.*, 2010; GONDIM *et al.*, 2004) and several mammals are intermediate

hosts (DONAHOE *et al.*, 2015). Over the years, birds have been intensively investigated as possible intermediate hosts for *N. caninum* (de BARROS *et al.*, 2018). Many serological and molecular studies have been conducted on domestic and wild bird populations (GONDIM *et al.*, 2010; MINEO *et al.*, 2011; DARWICH *et al.*, 2012; MOLINA-LOPEZ *et al.*, 2012), although the role of birds in the life cycle of *N. caninum* is not fully understood.

Little is known about the occurrence of *N. caninum* in marine animals, but previous studies have shown exposure to the parasite in otters, walruses, and dolphins (DUBEY *et al.*, 2003). However, the source of these infections is still unclear, and further studies are needed to better understand the life cycle of this protozoan in the marine environment (FUJII *et al.*, 2007; VILLAGRA-BLANCO *et al.*, 2019).

Although the sea and coastal birds are ecological sentinels of environmental health and Brazil hosts a large portion of the biodiversity of these birds, there is still little data on the occurrence of these protozoa. The aim of this study was to evaluate the presence of *T. gondii* and *N. caninum* DNA in seabirds from the sea coast of southern Brazil.

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Study area

The collection of the dead seabirds was carried out by the Santos Basin Beach Monitoring Project (PMP-BS) along the sea coast of southern Brazil, that includes the following municipalities: Barra Velha (26°37'56 "S and 48°41'05" W), Piçarras (26°45'50 "S and 48°40'18" W), Penha (26°46'10 "S and 48°38'45" W), Navegantes (26°53'56 " S and 48°39'15 "W), Itajaí (26 ° 54 '28" S and 48 ° 39' 43 "W), Balneário Camboriú (26 ° 59 '27" S and 48 ° 38' 06 "W), Itapema (27°05'25 "S and 48°36'41" W), Porto Belo (27°09'28 "S and 48°33'11" W), Bombinhas (27°07'54 "S and 48°31'40" W), Tijucas (27°14'29 " S and 48°38'01 "W), Governador Celso Ramos (27°18'53" S and 48°33'33 "W) (Figure 1).

Figure 1: Map of the sea coast of southern Brazil showing the municipalities where the birds were found.



Fonte: O autor (2022)

3.2.2 Sample collection

From August 2019 to March 2020, tissue samples (pectoral musculature, heart, and brain) were collected from 47 dead seabirds. The collection of the dead seabirds was carried out by the Santos Basin Beach Monitoring Project (PMP-BS) along the seacoast of southern Brazil, while carrying out their routine diagnostic protocol for the cause of death of the birds. The main causes of death of these birds were trauma, followed by asphyxia and cachexia syndrome. The age of the seabirds was determined based on plumage (GIACCARDI *et al.*, 1997) and the sex was determined by observation of the gonads at necropsy (GRIFFITHS, 2000). The tissues were stored frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until molecular analysis.

3.2.3 Tissue digestion and DNA extraction

Pepsin acid digestion was performed on all tissue samples. Approximately 3g of the tissues (pectoral muscle, brain, and heart) were macerated and digested in 40 ml of digestion solution containing 1.3 g pepsin, 3.5 ml HCL, and 2.5 g NaCl in 500 ml of distilled water at 37°C in a shaking water bath for 15 min (LINDSAY *et al.*, 1993).

After digestion, the digest was filtered through two layers of sterile cheesecloth and washed with 0.8% NaCl saline. The solution was centrifuged at $800 \times g$ for 10 minutes three times. The pellet from the last wash was stored in a microtube at -20°C .

DNA extraction from the pellet was performed using a commercial kit (Relia Prep gDNA Tissue Miniprep System Promega, Madison, WI, USA), following the manufacturer's protocol. A negative control, using nuclease-free water, was included to ensure no contamination during the extraction process. A nuclease-free water was included every 15 samples.

The extracted and purified DNA was quantified in the "NanoDrop One" apparatus (Gibco BRL, Rockville, MD, USA).

Samples were handled in a Class II Biological Safety Cabinet until inactivation of potentially infectious agents. Residues were discarded in potentially infectious waste Brazilian subgroup A4, which did not require previous treatment before final disposal.

3.2.4 Nested PCR (nPCR)

A nested PCR (nPCR) was performed to detect the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) of *T. gondii* and *N. caninum*. The primers were JS4 and CT2c as external primers and JS4b and CT2b as internal primers as previously described (SLAPETA *et al.*, 2002; SOARES *et al.*, 2011).

Each amplification was performed in 25 μ l reaction mixtures containing 80 ng of DNA, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen[®], Waltham, MA, USA), 1X buffer, 0.6 μ M of each primer and ultrapure water. Reactions were run in a PCR Thermal cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For the second amplification reaction, the same concentration of the reagents above was used with 1 μ L of the product from the first reaction. The cycling conditions began with one 3 min cycle at 94°C followed by 35 cycles at 94°C for 45s, 56°C for 30s, 72°C for 30s and a final extension step at 72°C for lasting 5 min. The expected size of the amplicon was about 500bp, and positive DNA control samples from *T. gondii* (RH strain) and *N. caninum* (NC-1 strain) and negative control (ultrapure water) were included in all reactions.

The amplification products were submitted to electrophoresis on a 1.5% agarose gel, 90 volts during 90 min, stained with SYBR[®] Safe DNA gel staining (Invitrogen[®]) in ThermoScientific[®] (Wilmington, USA) with a ladder molecular marker

100 bp, (Ludwig Biotec, Bela Vista - Alvorada, RS, Brazil) and observed in the ultraviolet transilluminator. The obtained PCR products were cleaned up enzymatically with Exo/SAP.

3.2.5 Sequencing

The purified PCR products were marked with BigDye v3.1 and were sequenced with internal forward and reverse primers in Genetic Analyzer 3500xL, using 50cm capillaries with Pop7 polymer (Gibco BRL). The sequences were analyzed and corrected using the electropherogram analysis using Geneious prime 2020.1 software. They then were compared with homologous sequences deposited at Genbank, at the NCBI (National Center for Biotechnology Information) using the Basic Local Alignment Search Tool program. The ITS1 sequences generated in the present study were deposited in GenBank.

3.2.6 Statistical analysis

The chi-square test was used to verify the association between birds positive in the n(PCR) for *T. gondii* and *N. caninum* and the variables. The variables considered were age (juvenile or adult) and sex (male or female). Associations with values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. Statistical analyzes were performed using R Core Team, version 3.6.3, 2020.

3.3 RESULTS

Of the 47 seabirds, 25 were juvenile, and 22 were adults, 24 females and 23 males. Nine species included in the study are listed on the IUCN Red List of Threatened Species as “least concern” and one species White-chinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*), as vulnerable (IUCN, 2020). The species of seabirds studied are described in table 1.

Table 1: Species of seabirds from four taxonomic orders along the seacoast of southern Brazil examined in the study.

Order Common name (species)	Number of birds (n)	Age	Sex
Charadriiforme			
	5		
Kelp gull (<i>Larus dominicanus</i>)	7	Adult	Male
Kelp gull (<i>Larus dominicanus</i>)	5	Adult	Female
Kelp gull (<i>Larus dominicanus</i>)	1	Juvenile	Female
Kelp gull (<i>Larus dominicanus</i>)	3	Juvenile	Male
Kelp gull (<i>Larus dominicanus</i>)	3	Juvenile	Female
Kelp gull (<i>Larus dominicanus</i>)	1	Juvenile	Female
Kelp gull (<i>Larus dominicanus</i>)	1	Adult	Female
Black skimmer (<i>Rynchops niger</i>)	1	Juvenile	Male
South American tern (<i>Sterna hirundinacea</i>)	1	Adult	Female
Common tern (<i>Sterna hirundo</i>)	1	Adult	Male
Great skua (<i>Stercorarius skua</i>)	1	Adult	Female
Suliformes			
	3		
Neotropic cormorant (<i>Phalacrocorax brasilianus</i>)	1	Juvenile	Male
Neotropic cormorant (<i>Phalacrocorax brasilianus</i>)	1	Juvenile	Female
Neotropic cormorant (<i>Phalacrocorax brasilianus</i>)	1	Juvenile	Male
Neotropic cormorant (<i>Phalacrocorax brasilianus</i>)	1	Juvenile	Female
Magnificent frigatebird (<i>Fregata magnificens</i>)	1	Adult	Male
Brown booby (<i>Sula leucogaster</i>)	2	Adult	Male
Brown booby (<i>Sula leucogaster</i>)	1	Adult	Female
Brown booby (<i>Sula leucogaster</i>)	1	Juvenile	Female
Brown booby (<i>Sula leucogaster</i>)	1	Juvenile	Male
Procellariiformes			
	2		
White-chinned petrel (<i>Procellaria aequinoctialis</i>)	1	Adult	Female
Manx shearwater (<i>Puffinus puffinus</i>)	2	Juvenile	Female
Manx shearwater (<i>Puffinus puffinus</i>)	2	Juvenile	Female
Manx shearwater (<i>Puffinus puffinus</i>)	1	Juvenile	Female
Manx shearwater (<i>Puffinus puffinus</i>)	3	Juvenile	Male
Sphenisciformes			
	3		
Magellanic penguin (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	1	Juvenile	Female
Magellanic penguin (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	1	Adult	Male
Magellanic penguin (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	1	Juvenile	Male

The nPCR were positive in 31.9% (15/47) seabirds of five species: kelp gull (*L. dominicanus*) 38% (8/21), manx shearwater (*P. puffinus*) 50% (4/8), neotropic cormorant (*P. brasilianus*) 25% (1/4), brown booby (*S. leucogaster*) 20% (1/5) and white-chinned petrel (*P. aequinoctialis*) 100% (1/1).

Toxoplasma gondii DNA was detected in 6.3% (3/47) of the pectoral muscles, in 8.51% (4/47) of the hearts and in 6.38% (3/47) brains of seven seabirds of two species. *Neospora caninum* DNA was detected in the heart [10.6% (5/47)] and in the brain [6.38% (3/47)] of eight seabirds of five species. The results of the nPCR are shown in Table 2.

Table 2: Results of n(PCR) for *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in tissues from seabirds from the sea coast of Southern Brazil.

Common name (species)	nPCR <i>T. gondii</i>				nPCR <i>N. caninum</i>			
	PM*	H*	B*	Sequence	PM*	H*	B*	Sequence
kelp gull (<i>L. dominicanus</i>)	-	-	+	MW021174	-	-	-	
kelp gull (<i>L. dominicanus</i>)	+	-	+	MW021175	-	-	-	
				MW021507				
kelp gull (<i>L. dominicanus</i>)	+	+	+	MW021176	-	-	-	
				MW021421				
				MW021508				
kelp gull (<i>L. dominicanus</i>)	-	+	-	MW021420	-	-	-	
kelp gull (<i>L. dominicanus</i>)	-	+	-	MW021422	-	-	-	
kelp gull (<i>L. dominicanus</i>)	-	-	-		-	+	-	MW022526
kelp gull (<i>L. dominicanus</i>)	-	-	-		-	+	-	MW022527
kelp gull (<i>L. dominicanus</i>)	-	-	-		-	+	-	MW022528
manx shearwater (<i>P. puffinus</i>)	-	+	-	MW023594	-	-	-	
manx shearwater (<i>P. puffinus</i>)	+	-	-	MW023595	-	-	-	
manx shearwater (<i>P. puffinus</i>)	-	-	-		-	-	+	MW023245
manx shearwater (<i>P. puffinus</i>)	-	-	-		-	+	-	MW023247
neotropic cormorant (<i>P. brasilianus</i>)	-	-	-		-	-	+	MW044666
brown booby (<i>S. leucogaster</i>)	-	-	-		-	-	+	MW044667
White-chinned Petrel (<i>P. aequinoctialis</i>)	-	-	-		-	+	-	MW023246

PM*: Pectoral muscle, H*: heart, B*: Brain.

The sequences obtained in the current study (MW021174 – MW021176) (MW021420 – MW021422), (MW021507 – MW021508), (MW023594 – MW 023595), (MW022526 – MW022528) (MW023245 – MW023247), (MW044666 – MW044667) shared 98-100% identity with *T. gondii* and *N. caninum* sequences deposited on the GenBank.

Of the 15 positive seabirds on the nPCR, 10 were juvenile, and five were adults, 11 were females, and four were males. There were no statistically significant associations between birds' positivity on nPCR for *T. gondii* and/ or *N. caninum*, and the variables (age and sex). The statistical analyzes of the association between positive and negative birds in the nPCR for *T. gondii* and *N. caninum*, considering each variable individually (age and sex) are shown in Table 3.

Table 3: The statistical analyzes of the association between positive and negative birds in the nPCR for *T. gondii* and *N. caninum*, considering each variable individually (age and sex).

Variable	Categories	n(PCR) <i>T. gondii</i>			n(PCR) <i>N. caninum</i>		
		Negative	Positive	<i>P</i> value	Negative	Positive	<i>P</i> value
Age	Adult	20 (50,0%)	2 (28,6%)	0,295	19 (48,7%)	3 (37,5%)	0,562
	Juvenile	20 (50,0%)	5 (71,4%)		20 (51,3%)	5 (62,5%)	
Sex	Male	20 (50,0%)	2 (28,6%)	0,295	20 (51,3%)	2 (25,0%)	0,175
	Female	20 (50,0%)	5 (71,4%)		19 (48,7%)	6 (75,0%)	

3.4 DISCUSSION

In this study, 15 (31.9%) seabirds were positive on the nPCR for *T. gondii* and/or *N. caninum*, which suggests that seabirds are susceptible to infection by these protozoa. These data are of interest to understanding the role of these birds in the life cycle of these protozoa.

Previous studies have isolated or reported the presence of *T. gondii* and *N. caninum* in the tissues of various species of wild birds, although most research has been conducted on *T. gondii* (DUBEY, 2002; DONAHOE *et al.*, 2015). There are few reports on tissue cyst-forming coccidia on seabirds species in South America. To our knowledge, this is the first description of the presence of *T. gondii* and *N. caninum* in kelp gull (*L. dominicanus*) and manx shearwater (*P. puffinus*) and *N. caninum* in neotropic cormorant (*P. brasiliensis*), brown booby (*S. leucogaster*) and white-chinned petrel (*P. aequinoctialis*).

There is little data on the occurrence of these two protozoa in seabirds, but some seroepidemiological studies in Spain, in Italy, in the Western Indian Ocean, (CABEZÓN *et al.*, 2016; NARDONI *et al.*, 2019a, 2019b; POULLE *et al.*, 2021) and in Brazil (GENNARI *et al.*, 2016; ACOSTA *et al.*, 2018) have demonstrated that these birds are exposed to *T. gondii* and *N. caninum*. Studies have reported the occurrence of anti-*T. gondii* antibodies in some species of gull in Europe, in the Western Indian Ocean, and China with a prevalence ranging from 0 to 21% (MIAO *et al.*, 2014; CABEZÓN *et al.*, 2016; POULLE *et al.*, 2021). In Brazil antibodies to *T. gondii* were found in 24 (34.8%) of 69 seabirds with titers that ranged from 5 to 640 (GENNARI *et al.*, 2016).

In the present study, *T. gondii* DNA was detected in seven (14.8%) and *N. caninum* in eight (17%) seabirds. Literature data reports different DNA detection values

of these protozoa in wild birds. Darwich *et al.*, (2012), investigating brain tissue samples from 201 wild birds of 14 species, detected DNA from *T. gondii* in 6% and *N. caninum* in 1.5%, while Lukásova *et al.*, (2017) investigating the occurrence of DNA of *T. gondii* and *N. caninum* in brain tissue of 110 wild and domestic birds in Africa found only three birds (2.7%) positive to *T. gondii* and no one positive to *N. caninum*. *Toxoplasma gondii* was isolated from tissues of 16.4 % (10/61) of naturally infected black-headed gulls (*Larus ridibundus*) in the Czech Republic (DUBEY, 2002). In a recent study in Turkey, the prevalence of *T. gondii* DNA was higher in wild birds of prey. These variations in the detection of *T. gondii* and *N. caninum* DNA between studies may be attributed to different environmental and or geographic conditions, the different bird species tested, and the sample size (CABEZÓN *et al.*, 2016; NARDONI *et al.*, 2019b).

No seabirds showed clinical signs of toxoplasmosis in the present study. Subclinical *T. gondii* infections are prevalent in wild birds, although fatal toxoplasmosis has been reported in free-ranging red-footed booby (WORK *et al.*, 2002) and in Little Penguins (CAMPBELL *et al.*, 2022).

The number of seabirds infected with *N. caninum* was higher than the number of birds infected with *T. gondii* in the present study. Literature data on the occurrence of *N. caninum* antibodies in wild birds showed variations in the occurrence values that varied from 0% to 34% between species, with waterfowls showing the highest seroprevalence (ROCHICHIANNI *et al.*, 2017; NARDONI *et al.*, 2019a) and raptors and geese a lower seroprevalence (KONELL *et al.*, 2019; SATO *et al.*, 2021). Studies suggest that susceptibility to *N. caninum* infection in birds may be species-specific, with birds of prey appearing to be more resistant, while passerines, pigeons, and waterfowls appear to be more susceptible to infection (ROCHICHIANNI *et al.*, 2017; de BARROS *et al.*, 2018).

Feeding habits play an important role in controlling the level of exposure to the parasite in various bird species (WILSON *et al.*, 2020; DUBEY, 2021). Seabirds can be infected with *T. gondii* and *N. caninum* by ingesting food and water contaminated with sporulated oocysts and consuming bradyzoites in tissue cysts of other intermediate hosts (CABEZÓN *et al.*, 2016). Anthropogenic pollution of the coastline with sewage or runoff from freshwater contaminated with *T. gondii* oocysts is probably the key factor in the epidemiology of toxoplasmosis in the marine environment (CABEZÓN *et al.*, 2016). Studies have shown that *T. gondii* oocysts are transported to

marine ecosystems through sewage and freshwater runoff and remain infectious for up to 24 months (MARINO *et al.*, 2019; SHAPIRO *et al.*, 2019). In aquatic ecosystems, oocysts can be accumulated by filtration of bivalve mollusks (LINDSAY *et al.*, 2004) or fish filtration (MASSIE *et al.*, 2010), and this has been suggested as a route of transmission since these fish and mollusks are a source of food for seabirds and marine mammals.

There are few studies on *N. caninum* in the marine environment, but in some, it has been shown that otters, walruses, and dolphins have been exposed to the protozoan (DUBEY *et al.*, 2003; FUJII *et al.*, 2007). Because *N. caninum* is biologically similar to *T. gondii*, contamination with oocysts in the environment is believed to play an important role in the epidemiology of *N. caninum* as well, although the number of *N. caninum* oocysts shed in the feces of dogs is significantly less than the number of *T. gondii* oocysts shed by cats. A single cat can eliminate more than 20 million oocysts (DUBEY, 1995), while the maximum number of oocysts shed by dogs is generally less than one million (SCHARES *et al.*, 2001).

Most seabirds positive for *T. gondii* and *N. caninum* were juvenile and females although age and sex were not statistically associated with DNA detection. This higher number of infected juvenile seabirds may be due to seasonal fluctuations in bird populations. It can be assumed that it is due to the time of collection of the samples, which occurred between August and March, a period in which there is a decrease in adults and an increase in juvenile birds (BRANCO, 2004).

In the present study, the seabird most affected was the kelp gull (*L. dominicanus*). This result indicates widespread exposure to *T. gondii* and *N. caninum* in this seabird species. The Kelp Gull (*L. dominicanus*) belongs to the order Charadriiformes and is the most abundant seabird on the sea coast of southern Brazil (SOARES; SCHIEFLER 1995; BRANCO, 2004). The increase in the population of kelp gulls is attributed to the great availability of food found in garbage of human origin and the discards of fishing (BARBIERI, 2008). The species is considered one of the most opportunistic and generalist species among seabirds. Understanding the spread of *T. gondii* and *N. caninum* in wild birds, particularly those with those kinds of feeding behavior (opportunistic and generalist), is of interest for understanding the epidemiologic involvement of these birds in the maintenance and dissemination of those protozoans (CABEZÓN *et al.*, 2016).

The DNA sequences obtained in the present study showed 98-100% identity with *T. gondii* and *N. caninum* sequences deposited in the GenBank. The comparison of the *T. gondii* nucleotide sequences from this study revealed similarities with some *T. gondii* sequences found in marine mammals (MILLER *et al.*, 2001).

3.5 CONCLUSION

Seabirds are susceptible to infection with *T. gondii* and *N. caninum* by environmental contamination or predation of infected species. This study demonstrated that kelp gull (*L. dominicanus*) and manx shearwater are naturally infected by *T. gondii* and *N. caninum* and neotropic cormorant (*P. brasiliensis*), brown booby (*S. leucogaster*) and white-chinned petrel (*P. aequinoctialis*) are naturally infected by *N. caninum*. Further investigations are needed to clarify the role of these birds in the life cycle of these protozoa.

Ethical statement

This study was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Federal University of the State of Paraná, in southern Brazil (protocol number 061/2018), and through the SISBIO federal authorization system (number 64096-2).

Acknowledgements

We would like to thank the beach monitoring project team - Santos Basin (PMP-BS) in the Santa Catarina / Paraná (SC / PR) for the support and assistance during the sampling procedures.

REFERENCES

ACOSTA, I.C.L.; SOARES R.M.; MAYORGA, L.F.S.P.; ALVES, B.F.; SOARES, H.S.; GENNARI, S.M. Occurrence of tissue cyst forming coccidia in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) rescued on the coast of Brazil. **PLoS ONE** v.13, n. 2, p. e0209007, 2018.

BRANCO, J.O. Aves marinhas das Ilhas de Santa Catarina. In: **Aves marinhas e insulares brasileiras: bioecologia e conservação**. Editora da UNIVALI, Itajai, pp.15-36, 2004.

BARBIERI, E. Diversity of the diet and the behavior of *Larus dominicanus* in the Keller Peninsula, King George Island, South Shetland. **O Mundo da Saúde**, v. 32, n.3, p. 302-307, 2008.

CABEZÓN, O.; GARCIA-BOCANEGRA, I.; MOLINA-LÓPEZ, R.; MARCO I.; BLANCO, J.M.; HOFLE, U.; MARGALIDA, A.; BACH-RAICH, E.; DARWICH, L.; ECHEVERRÍA, I.; OBÓN, E.; HERNÁNDEZ, M.; LAVIN, S.; DUBEY, J.P.; ALMERÍA, S. Seropositivity and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in wild birds from Spain, **Plos One**, v.6, n.12, 2011.

CABEZÓN, O.; CERDA-CUELLAR, M.; MORERA V.; GARCÍA-BOCANEGRA, I.; GONZALEZ-SOLÍS, J.; NAPP, S.; RIBAS, M.P.; BLANCH-LÁZARO, B. FERNÁNDEZ AGUILAR, X.; ANTILLES, N.; LOPEZ-SORIA, S.; LORCA-ORO, C.; DUBEY, J.P.; ALMERÍA, S. *Toxoplasma gondii* infection in seagull chicks is related to the consumption of freshwater food resources. **PLoS ONE** v. 11, p. e0150249, 2016.

CAMPBELL, K.; PAPANINI, A.; GOMEZ, A.B.; CANNELL, B.; STEPHENS, N. Fatal toxoplasmosis in Little Penguins (*Eudyptula minor*) from Penguin Island, Western Australia. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 17, p. 211-217, 2022.

CONRAD, P.A.; MILLER, M.A.; KREUDER, C.; JAMES, E.R.; MAZET, J. DABRITZ, H.; JESSUP, D.A.; GULLAND, F.; GRIGG, M. E. Transmission of *Toxoplasma*: Clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1155-1168, 2005.

DARWICH, L.; CABEZÓN, O.; ECHEVERRIA, I.; PABÓN, M.; MARCO, I.; MOLINA-LOPEZ, R.; ALARCIA-ALEJOSE, O.; LOPEZ-GATIUS, F.; LAVÍN, S.; ALMERÍA, S.; Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 377– 381, 2012.

de BARROS, L.D.; MIURA, A.C.; MINUTTI, A.F.; VIDOTTO O.; GARCIA J.L., *Neospora caninum* in birds: A review. **Parasitology International**, v. 67 p.397–402, 2018.

DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; & ŠLAPETA, J. 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.

DUBEY, J.P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. **Journal of Parasitology** v.81, p.410–415, 1995.

DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 121-153, 2002.

DUBEY, J. P.; ZARNKE, R.; THOMAS, N. J.; WONG, S. K.; VAN BONN, W.; BRIGGS, M.; DAVIS, J. W.; EWING, R.; MENSE, M.; KWOK, O. C. H.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. *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. **Toxoplasmosis of animal and humans**, 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.

DUBEY, J.P.; MURATA, F.H.A.; CERQUEIRA-CÉZAR, C.K.; KWOK, O.C.H.; GRIGG, M.E. Recent epidemiologic and clinical importance of *Toxoplasma gondii* infections in marine mammals: 2009-2020. **Veterinary Parasitology**, v. 288, p. 109296, 2020.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of animals and humans**, 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 2021.

FUJII, K.; KAKUMOTO, C.; KOBAYASHI, M.; SAITO, S.; KARIYA, T.; WATANABE, Y.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; SUZUKI, M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in seals around Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 4, p. 393-398, 2007.

GENNARI, S. M.; NIEMEYER, C.; SOARES, H. S.; MUSSO, C. M.; SIQUEIRA, G. C. C.; CATÃO-DIAS, J. L.; DIAS, R. A.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in seabirds from Abrolhos. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 50-52, 2016.

GIACCARDI, M.; YORIO, P.; LIZURUME, E. Patrones estacionales de la gaviota cocinera (*L. dominicanus*) em um basural Patagónico y sus relaciones com el manejo de residuos urbanos y pesqueiros. **Ornitologia Neotropical**, v. 8, p. 77-84, 1997.

GRIFFITHS, R. Sex identification in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v.9, n. 1, p.14–26, 2000.

GONDIM, L.F.P.; MCALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34 p.159–161, 2004.

GONDIM, L.S.; ABE-SANDES, K.; UZÊDA, R.S.; SILVA, M.S.; SANTOS, S.L.; MOTA, R.A.; VILELA, S.M.; GONDIM, L.F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 168, p. 1-2, 2010.

JONES, J.L.; DUBEY, J.P., Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. **Experimental Parasitology**, v.124, p. 10-25, 2010.

KING, J.S., ŠLAPETA, J., JENKINS, D.J., AL-QASSAB, S.E., ELLIS, J.T., WINDSOR, P.A., Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 945–950, 2010.

KONELL A.L.; SATO, A.P.; MALAGUINI, N.P.; DOS ANJOS, A.; FERREIRA, R.F.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Serosurvey of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* in geese (*Anser* sp.) from urban parks and captivity. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 221-228, 2019.

LINDSAY, D.S.; SMITH, P.C.; HOERR, F.J.; BLAGBURN, B.L. Prevalence of encysted *Toxoplasma gondii* in raptors from Alabama. **The Journal of Parasitology**, v. 79, n.6, p. 870-873, 1993.

LINDSAY, D.S.; COLLINS, M.V.; MITCHELL, S.M.; WETECH, C.N.; ROSYPAL, A.C.; FLICK, G.J.; ZAJAC, A.M.; LINDQUIST, A.; DUBEY, J.P. Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Parasitology**, v. 90, p.1054–1057, 2004.

LUKÁŠOVÁ, R.; KOBÉDOVÁ, K.; HALAJIAN, A.; BÁRTOVÁ, E.; MURAT, J.B.; RAMPEDI, K.M.; LUUS-POWELL, W.J. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in birds from South Africa. **Acta Tropica**, v.178, p. 93-96, 2018.

MARINO, A.M.F.; GIUNTA, R.P.; SALVAGGIO, A.; CASTELLO, A.; ALFONZETTI, T.; BARBAGALLO, A.; APARO, A.; SCALZO, F.; REALE, S.; BUFFOLANO, W.; PERCIPALLE, M. *Toxoplasma gondii* in edible fishes captured in the Mediterranean basin. **Zoonoses and Public Health**, v. 66, n. 7, p. 826-834, 2019.

MASSIE, G.N., WARE, M.W., VILLEGAS, E.N., BLACK, M.W. Uptake and transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by migratory filter-feeding fish. **Veterinary Parasitology**, v.169, p. 296–303, 2010.

MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28 p. 1473–1478, 1998.

MIAO, Q.; HAN, J. Q.; XIANG, X.; YUAN, F. Z.; LIU, Y. Z.; DUAN, G.; ZHU, X. Q.; ZOU, F. C. Prevalence of antibody to *Toxoplasma gondii* in black-headed gulls

(*Chroicocephalus ridibundus*), Dianchi lake, China. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 50, n. 3, p. 717-719, 2014.

MILLER, M. A.; SVERLOW, K.; CROSBIE, P. R.; BARR, B. C.; LOWENSTINE, L. J.; GULLAND, F. M.; PACKHAM, A.; CONRAD, P.A. Isolation and characterization of two parasitic protozoa from a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*) with meningoencephalomyelitis. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 816-822, 2001.

MINEO, T. W.; CARRASCO, A. O.; RASO, T. F.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2-4, p. 352-355, 2011.

MOLINA-LÓPEZ, R.; CABEZÓN, O.; PABÓN, M.; DARWICH, L.; OBÓN, E.; LOPEZ-GATIUS, F.; DUBEY, J.P.; ALMERÍA, S. 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

NARDONI, S.; POLI, A.; VARVARO, I.; ROCCHIGIANI, G.; CECCHERELLI, R.; MANCIANTI, F. Detection of *Neospora caninum* DNA in wild birds from Italy. **Pathogens**, v.8, n. 4, 1–6, 2019a.

NARDONI, S.; ROCCHIGIANI, G.; VARVARO, I.; ALTOMONTE, I.; CECCHERELLI, R.; MANCIANTI, F. Serological and Molecular Investigation on *Toxoplasma gondii* Infection in Wild Birds. **Pathogens**, v. 8, n. 2, p. 58, 2019b.

PETRY, M. V.; SCHERER, J.F.M.; SCHERER, A. L. Ocorrência, alimentação e impactos antrópicos de aves marinhas nas praias do litoral do Rio Grande do Sul, sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 20, n. 1, p. 65-70, 2012.

POULLE, M.L.; LE CORRE, M.; BASTIEN, M.; GEDDA, E.; FEARE, C.; JAEGER, A.; LAROSE, C.; SHAH, N.; VOOGT, N.; GÖPPER, B.; LAGADEC, E.; ROCAMORA, G.; GEERS, R.; AUBERT, D.; VILLENA, I.; LEBARBENCHON, C. Exposure of pelagic seabirds to *Toxoplasma gondii* in the Western Indian Ocean points to an open sea dispersal of this terrestrial parasite. **Plos One**, v. 16, n. 8, p. e0255664, 2021.

ROCCHIGIANI, G.; POLI, A.; NARDONI, S.; PAPINI, R.; MANCIANTI, F. *Neospora caninum* in Wild Waterfowl: Occurrence of Parasite DNA and Low Antibody Titers. **Journal of Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 142-145, 2017.

SATO, A.P.; GOULART, M.A.; KONELL, A.L.; KOCH, M.O.; FONSECA, F.M.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Serosurvey of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* sp. in captive raptors and risk factors analysis. **Parasitology International**, v. 82, p. 102312, 2021.

SCHARES, G.; HEYDORN, A.O.; CUPPERS, A.; CONRATHS, F.J.; MEHLHORN, H. *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. **Parasitology Research** v. 87, p. 808–816, 2001.

SHAPIRO, K.; BAHIA-OLIVEIRA, L.; DIXON, B.; DUMÈTRE, A.; DE WIT L.A.; VANWORMER E.; VILLENA, I. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. **Food Waterborne Parasitology**, v. 15, p. e00049, 2019.

SLAPETA, J. R.; KOUDELA, B.; VOTÝPKA, J.; MODRÝ, D.; HOREJS, R.; LUKES, J. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **The Veterinary Journal**, v.163, n. 2, p.147-154, 2002.

SOARES, R. M.; LOPES, E. G.; KEID, L. B.; SERCUNDES, M. K.; MARTINS, J.; RICHTZENHAIN, L. J. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the *H. heydorni* RAPD fragment AP10. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 168-172, 2011.

SOARES, M.; SCHIEFLER, A. F. Reprodução de *Larus dominicanus* (AVES, Laridae), na Ilhota da Galeta, Laguna, SC, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v 8, n.1, p. 313-316, 1995.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii* from: animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, 1217-1258, 2000.

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-1 <http://www.iucnredlist.org> 2020 (accessed October 2020).

VANWORMER, E.; MILLER, M.A.; CONRAD, P.A.; GRIGG, M.E.; REJMANEK, D. CARPENTER, T. E.; MAZET, J. A. Using Molecular Epidemiology to Track *Toxoplasma gondii* from Terrestrial Carnivores to Marine Hosts: Implications for Public Health and Conservation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2852, 2014.

VILLAGRA-BLANCO, R.; SILVA, L. M.; CONEJEROS, I.; TAUBERT, A.; HERMOSILLA, C. Pinniped-and cetacean-derived ETosis contributes to combating emerging apicomplexan parasites (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*) circulating in marine environments. **Biology**, v. 8, n. 1, p. 12, 2019.

VOTIER, S.C.; SHERLEY, R. B. Seabirds. **Current Biology**, v. 27, n. 11, p. R448-R450, 2017.

WORK, T. M.; MASSEY, J. G.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in three species of native and introduced Hawaiian birds. **Journal of Parasitology**, v. 88, n.5, p. 1040-1042, 2002.

4 CAPÍTULO III - MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Sarcocystis* spp. IN SEABIRDS FROM SOUTHERN BRAZIL

Ana Paula Sato^a, Tiffany Christiny Emmerich da Silva^b, Thamires Pires de Pontes^b, Adrien Wilhelm Dilger Sanches^c, Petras Prakas^d, Rosangela Locatelli-Dittrich^a

^aDepartment of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, Rua dos Funcionários 1540, CEP 80035-050, Curitiba, Paraná, Brazil.

^bSantos Basin Beach Monitoring Project (PMP-BS), Seabird Rehabilitation Laboratory, University of Vale do Itajaí, Rua Maria Emília da Costa, CEP: 88-385-00090, Armação - Penha, Santa Catarina, Brazil

^cAutonomous veterinarian. R Eng Roberto. G. P. Leite, 711, Vista Alegre, CEP-80820-220, Curitiba, Paraná, Brazil.

^dNature Research Centre, Akademijos 2, 08412 Vilnius, Lithuania

Publicado na revista *Parasitology International* no dia 10 de maio de 2022, citado a seguir: Sato, A P., Silva, T.C.E., Pontes, T.P., Sanches, A.W.D., Prakas, P., Locatelli-Dittrich, R. Molecular characterization of *Sarcocystis* spp. in seabirds from southern Brazil. ***Parasitology International***, v. 90, 2022.

ABSTRACT

Sarcocystis spp. are cyst forming apicomplexan parasites that infect many vertebrates including birds. *Sarcocystis* spp. infection was investigated in tissue samples (pectoral muscles, heart, and brain) of 47 dead seabirds collected from the coastline of Santa Catarina State SC – Brazil, between August 2019 and March 2020. A portion of each tissue was fixed in 10% buffered formalin for histopathologic analysis while DNA was extracted from another portion and screened using nested-PCR targeting ITS1. Based on molecular analysis, *Sarcocystis* spp. were identified in 15/47 (31.9%) seabirds of five species, kelp gull (*Larus dominicanus*), manx shearwater (*Puffinus puffinus*), neotropic cormorant (*Phalacrocorax brasilianus*), brown booby (*Sula leucogaster*) and great skua (*Stercorarius skua*). Microscopically visible sarcocysts were observed only in the pectoral muscle of four seabirds 8.5% (4/47), while in one brown booby, sarcocysts were seen in both pectoral and cardiac muscles. Two types of sarcocysts, thin walled ($\leq 1 \mu\text{m}$) and thick-walled ($\geq 2 \mu\text{m}$) were identified. Based on ITS1 sequence comparison, *S. halioti*, *S. falcatula* and three not yet described *Sarcocystis* spp. were detected. Phylogenetically, *S. falcatula* isolates were classified as two distinct clusters. This is the first confirmation of *S. halioti* in seabird's species in South America and *S. falcatula* in birds of the order Charadriiformes. Further molecular studies are needed to understand the epidemiology of the *Sarcocystis* spp. infection and its impact on the health of seabirds.

Key words: *Sarcocystis*, gulls, marine environment, Brazil, molecular characterization, ITS1.

4.1 INTRODUCTION

Sarcocystis species are apicomplexan parasites infecting mammals, birds, and reptiles with a worldwide distribution [1]. These protozoans have an obligatory two-host prey-predator life cycle. Sexual development of oocysts/sporocysts occurs in the intestinal mucosa of the definitive hosts and asexual multiplication in vascular endothelial cells (meront stage) and in muscles or CNS (sarcocyst stage) of the intermediate host [2]. Intermediate hosts usually acquire *Sarcocystis* spp. infection through the ingestion of oocysts/sporocysts in water or food with faecal contamination. Definitive hosts most commonly acquire *Sarcocystis* spp. infection by the ingestion of infected intermediate prey species during predation or scavenging [3].

To date 27 valid *Sarcocystis* species using birds as intermediate hosts have been described [4]. Two of the most often studied species, *S. falcatula* and *S. calchasi* are pathogenic for Passeriformes, Psittaciformes, Columbiformes, Strigiformes, Falconiformes and Accipitriformes [5-7]. *Sarcocystis falcatula* may induce severe lung injuries, and *S. calchasi* causes severe meningoencephalitis [8,9]. Clinical sarcocystosis due to *S. falcatula* and *S. calchasi* infections has been reported in birds of prey, psittacines and pigeons [5,9,10,11].

Seabirds are a highly diverse group of species adapted to live in the marine environment, inhabiting coastal areas, estuaries, islands, and coastal wetlands [12]. These birds are predators, foraging over large geographic areas and feeding at different trophic levels [13]. Due to the diversity of habitats, dependence on different environments for their vital activities, and their reproductive behavior in colonies, seabirds are prone to infections by parasitic agents [14-15].

Previous studies based on the microscopy analysis revealed the presence of sarcocysts of *Sarcocystis* spp. in some species of seabirds [16-19]. However, morphological characterisation of sarcocysts in muscle tissues is usually not enough for the identification of *Sarcocystis* species [20, 21]. Instead, molecular analysis is essential to identify known *Sarcocystis* species and for description of new species [22, 23]. In Lithuania, *S. lari* was observed in great black-backed gulls (*Larus marinus*) [24], *S. haliyeti* was confirmed in the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*) [25], and four *Sarcocystis* species, *S. columbae*, *S. haliyeti*, *S. lari* and *S. wobeseri* were detected in herring gulls (*Larus argentatus*) [26, 27]. A fatal sarcocystosis associated with *S. calchasi* and *S. falcatula* has been described in Brandt's cormorant (*Phalacrocorax*

penicillatus) from Southern California, USA [28]. Furthermore, fatal pneumonia due to the presence of *S. falcatula* was reported in one African penguin (*Spheniscus demersus*), and two southern rockhopper penguins (*Eudyptes chrysocome*) [29]. Latest results indicate that *Sarcocystis* infection might be harmful to seabirds. There are a few reports on molecular identification of *Sarcocystis* spp. from seabirds in South America. Therefore, the aim of this study was to identify *Sarcocystis* species by molecular and histopathological analysis in seabirds from the seacoast of southern Brazil.

4.2 MATERIAL AND METHODS

4.2.1 Ethical statement

This study was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Federal University of the State of Paraná, in southern Brazil (protocol number 061/2018), and through the SISBIO federal authorization system (number 64096-2).

4.2.2 Study area and sample gathering

Between August 2019 and March 2020 tissue samples (pectoral muscle, heart, and brain) from 47 dead seabirds from different taxonomic orders: (Charadriiformes, Suliformes, Procellariiformes, and Sphenisciformes) were investigated for the presence of *Sarcocystis* spp. (TABLE 1).

TABLE 1. The list of seabird species examined for *Sarcocystis* spp.

Order Common name (species)	N
Charadriiformes	5
kelp gull (<i>Larus dominicanus</i>)	21
black skimmer (<i>Rynchops niger</i>)	1
South american tern (<i>Sterna hirundinacea</i>)	1
common tern (<i>Sterna hirundo</i>)	1
great skua (<i>Stercorarius skua</i>)	1
Suliformes	3
neotropic cormorant (<i>Phalacrocorax brasilianus</i>)	4
magnificent frigatebird (<i>Fregata magnificens</i>)	1
brown booby (<i>Sula leucogaster</i>)	5
Procellariiformes	2
white-chinned petrel (<i>Procellaria aequinoctialis</i>)	1
manx shearwater (<i>Puffinus puffinus</i>)	8
Sphenisciformes	1
magellanic penguin (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	3

Of the 47 seabirds, 24 were females and 23 were males while 25 were considered juvenile and 22 classed as adults, with aging based on plumage [30]. The collection of the dead seabirds was carried out by the Santos Basin Beach Monitoring Project (PMP-BS) along the seacoast of southern Brazil, while carrying out their routine diagnostic protocol for the cause of death of the birds. The main causes of death of these birds were trauma, followed by asphyxia and cachexia syndrome.

4.2.3. Necropsy, histopathology, and fresh tissue sampling

A general examination determined the sex, nutritional status and identified gross lesions of the skin, liver, heart, skeletal muscles, respiratory, urinary, and digestive systems, eyes, and encephalon. Two samples, measuring 0.4 × 0.8 cm, were gathered from heart, pectoral muscle, and brain, and fixed in 10% buffered formalin. After 24 hours the samples were routinely processed for histological analysis and were embedded into paraffin blocks, from which 4.0 µm sections were sectioned, stained with hematoxylin and eosin (H&E) and mounted on histological slides. Slides were examined at 40×, 100×, 400× and 1000× magnifications, using a DM500 optical microscope (Leica, Wetzlar, Germany). One portion of fresh tissues (heart, pectoral muscles, and brain) were also collected and stored at -20 °C for molecular analysis.

4.2.4 Tissue digestion and DNA extraction

Pepsin acid digestion was performed on all tissue samples. Approximately 5 g of tissue was taken, and pepsin digestion was performed as described previously [31]. The digest was then filtered through two layers of sterile gauze and washed (three times) with 0.85% NaCl saline. The solution was centrifuged at $800 \times g$ for 10 minutes. The pellet from the last wash was stored in microtubes at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. DNA extraction was performed using a commercial kit, Relia Prep gDNA Tissue Miniprep System Promega (Madison, USA), following the manufacturer's protocol. The DNA extraction from the negative control (ultra-pure water) was performed along with the tissue's samples. The DNA extraction from the positive control (*S. neurona*) was performed separately.

4.2.5 Nested PCR and sequencing

A nested PCR (nPCR) targeting 3' end of 18S rRNA gene, the complete internal transcribed spacer 1 (ITS1) and 5' end of 5.8S rRNA gene was used to detect the protozoa by molecular analysis. The external primers were JS4 and CT2c, and internal primers were JS4b and CT2b as previously described [32,33]. The chosen primers were specific for members of the family Sarcocystidae. Each amplification was performed in 25 μl reaction mixtures, containing 80 ng of DNA, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs, 1U Platinum TAQ polymerase (Invitrogen® - Carlsbad, USA), 1X buffer, 0.6 μM of each primer and ultrapure water. For the second amplification reaction, the same reagents concentration with 1 μL of the product from the first reaction was used. The cycling conditions began with one 3min cycle at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ followed by 35 cycles at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 45s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30s and a final extension step at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min. The positive DNA control sample isolated from *S. neurona* (SNR37 strain), and a negative control (ultrapure water) were included in all reactions. The amplification products were detected by electrophoresis 90 volts during 90 min on 1.5 % agarose gel stained with SYBR® Safe DNA gel stain (Kasvi, K9-16C) and observed in the ultraviolet transilluminator. The obtained PCR products were cleaned up enzymatically with Exo/SAP. The purified PCR products were marked with BigDye v3.1 and sequenced with internal forward and reverse primers.

4.2.6. Sequence analyses

The sequences were manually corrected with Geneious prime 2020.1 software, then compared with homologous sequences deposited at NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank using the BLAST program [34]. Sequences were aligned using MUSCLE program implemented in the MEGA7 [35]. Phylogenetic analysis included the selection of a nucleotide substitution model and construction of phylogenetic trees under Bayesian inference; carried out with TOPALi v2.5 [36]. The ITS1 sequences generated in this study are available in GenBank with accession numbers MW822660–MW822675.

4.3 RESULTS

4.3.1 Molecular and phylogenetic investigation

Sarcocysts spp. were detected in 15 out of 47 (31.9%) seabirds. These species were identified in all of the three tissue types examined, most commonly confirmed in the pectoral muscle (12 cases); followed by the brain (3 cases) and the heart (1 case). The parasite DNA was detected in 7 (33.3%) kelp gulls (*Larus dominicanus*), in 3 (60%) brown boobies (*Sula leucogaster*), in 3 (75%) neotropic cormorants (*Phalacrocorax brasilianus*), also in 1 (100%) manx shearwater (*Puffinus puffinus*) and 1 (100%) great skua (*Stercorarius skua*).

The ITS1 sequences obtained showed considerably differences in length. Namely 11 sequences were longer, ranging 1028–1034 in bp (COR39, MP1, MP15, MP3, MP15, MP22, MP6, MP39, MP20, CER29, MP7 and MP23), whereas five were 831–866 bp-long (isolates MP30S, MP36S, CER16, CER17 and MP9) (TABLE 2).

TABLE 2. Molecular identification of *Sarcocystis* species by ITS sequence analysis.

Isolate	Host species	Tissue type	<i>Sarcocystis</i> species	GenBank Acc. No. (length in bp)	Similar GenBank sequences
MP30S	neotropic cormorant	PM	<i>S. halioti</i>	MW822660 (831)	MF946591
CER16	kelp gull	B	<i>S. halioti</i>	MW822661 (831)	MN450344
CER17	kelp gull	B	<i>S. halioti</i>	MW822662 (831)	MF946594
MP36S	manx shearwater	PM	<i>S. halioti</i>	MW822663 (831)	MN450340
MP39, COR39	brown booby	PM, H	<i>S. falcatula</i> *	MW822670, MW822665 (1028)	MG493471, MG626535, MK803262, AF098246
MP1	brown booby	PM	<i>S. falcatula</i>	MW822666 (1028)	MG493471, MG626535, MK803262, AF098246
MP15	brow booby	PM	<i>Sula leucogaster</i>	MW822667 (1028)	MH626538, MK803662
MP6	kelp gull	PM	<i>S. falcatula</i>	MW822668 (1028)	MG493471, MG626535, MK803262, AF098246
MP22	kelp gull	PM	<i>S. falcatula</i>	MW822669 (1028)	MG493471, MG626535, MK803262, AF098246
MP3	kelp gull	PM	<i>S. falcatula</i>	MW822671 (1028)	MG493471, MG626535, MK803262, AF098246
MP20	neotropic cormorant	PM	<i>S. falcatula</i>	MW822672 (1030)	MG493471, MG626535, MK803262, AF098246
CER29	great skua	B	<i>S. falcatula</i>	MW822673 (1028)	AF098244, KT207458, AH009986, AF204230
MP23	neotropic cormorant	PM	<i>Sarcocystis</i> sp.**	MW822675 (1034)	MK803362, KT207458, MW822673, AF098242
MP7	kelp gull	PM	<i>Sarcocystis</i> sp.**	MW822674 (1023)	MW822671, MH626538, KT207458, AF098243
MP9	kelp gull	PM	<i>Sarcocystis</i> sp.**	MW822664 (866)	MF946599, MN450360, JQ733510

PM: Pectoral muscle; B: Brain; H: Heart. **S. falcatula* were detected in PM and in H from the same bird.
 ** Based on ITS1 sequence comparison isolates MP9, MP7 and MP23 are considered to represent three different *Sarcocystis* species.

The sequences that significantly varied in length also showed large differences in nucleotide composition. The longer sequences obtained in the present study showed 90.5–100% similarity between each other, six of them being identical (MW822665–MW822670). These longer sequences demonstrated the highest similarity (89.5–99.9% similarity, query coverage > 90%) with *S. falcatula*, *S. lindsayi*, *S. neurona* and *S. speeri*, whose definitive hosts are opossums (*Didelphis* spp.). Based on phylogenetic analysis, nine isolates (MW822665–MW822673) were assigned to *S. falcatula* (Fig. 1). In the phylogenetic tree, isolates of *S. falcatula* were divided into two groups. Eight isolates obtained from the heart (COR39) and from the pectoral muscles of Brown Boobies (MP1, MP15 and MP39), from the pectoral muscles of Kelp Gulls (MP3, MP6 and MP22), and from the pectoral muscles of neotropic cormorant (MP20) (MW822665–MW822672) fell into a cluster consisting of *S. falcatula* (AF098245, AF098246 and MH626538) and *Sarcocystis* sp. (*S. falcatula*-like) isolates derived from Brazil (MG493471, MK803362) and from the USA (AY082647). While isolate CER29 obtained from the brain of a great skua (MW822673) was grouped with *S. falcatula* (AY082638, AY082639, AF098242, AF098243 and AF098244). The MP23 isolate obtained from the pectoral muscles of neotropic cormorant (MW822675) displayed 98.7% sequence similarity with *Sarcocystis* sp. (DQ768306) from the African grey parrot (*Psittacus erithacus*) from Costa Rica [37] and 98.7% sequence similarity (30% query coverage) with *Sarcocystis* sp. (KP871747) from *Didelphis* sp. from Brazil [38]. It should be emphasized that the bigger cluster of *S. falcatula* was more closely related to *S. neurona* and *S. speeri* than to remaining isolates of *S. falcatula*. The MP7 isolate derived from the pectoral muscles of Kelp Gull (MW822674) demonstrated 89.6–90.8 similarity (query coverage > 90%) with *Sarcocystis* spp. employing *Didelphis* spp. as definitive hosts. In the phylogram, *Sarcocystis* sp. MP7 was the sister taxa to *S. lindsayi*. Based on phylogenetic results *Sarcocystis* sp. MP23 and *Sarcocystis* sp. MP7 are putative new species most closely related to *Sarcocystis* spp. transmitted by opossums.

The shorter sequences displayed 72.4–100% similarity between each other, three of them being identical (MW822660–MW822662). Four of the shorter sequences obtained from the pectoral muscles of neotropic cormorant (MP30S), from the pectoral muscles of manx shearwater (MP36S) and from the brains of kelp gulls (CER16 and

CER17) (MW822660–MW822663) shared 98.2–99.0% similarity with *S. halioti* (JQ733513, MH130209, MF946589–MF946596, MN450340–MN450356); whilst the 866 bp sequence generated from the pectoral muscles of a Kelp Gull (isolate MP9, MW822664) demonstrated 88.6–89.9% similarity with *S. lari* (JQ733510, MN450357–MN450364, MF946597–MF946609), 77.3–79.0% similarity with *Sarcocystis* sp. (HQ184185, MH918015, MW960103-06) and 77.4–77.6% similarity with *S. canis* (DQ176645, MW136927). In the phylogenetic tree, *Sarcocystis* sp. isolate MP9 formed a sister branch to *S. lari* (Fig. 2), whereas *S. halioti* sequences generated in this study were placed together with other sequence of *S. halioti*.

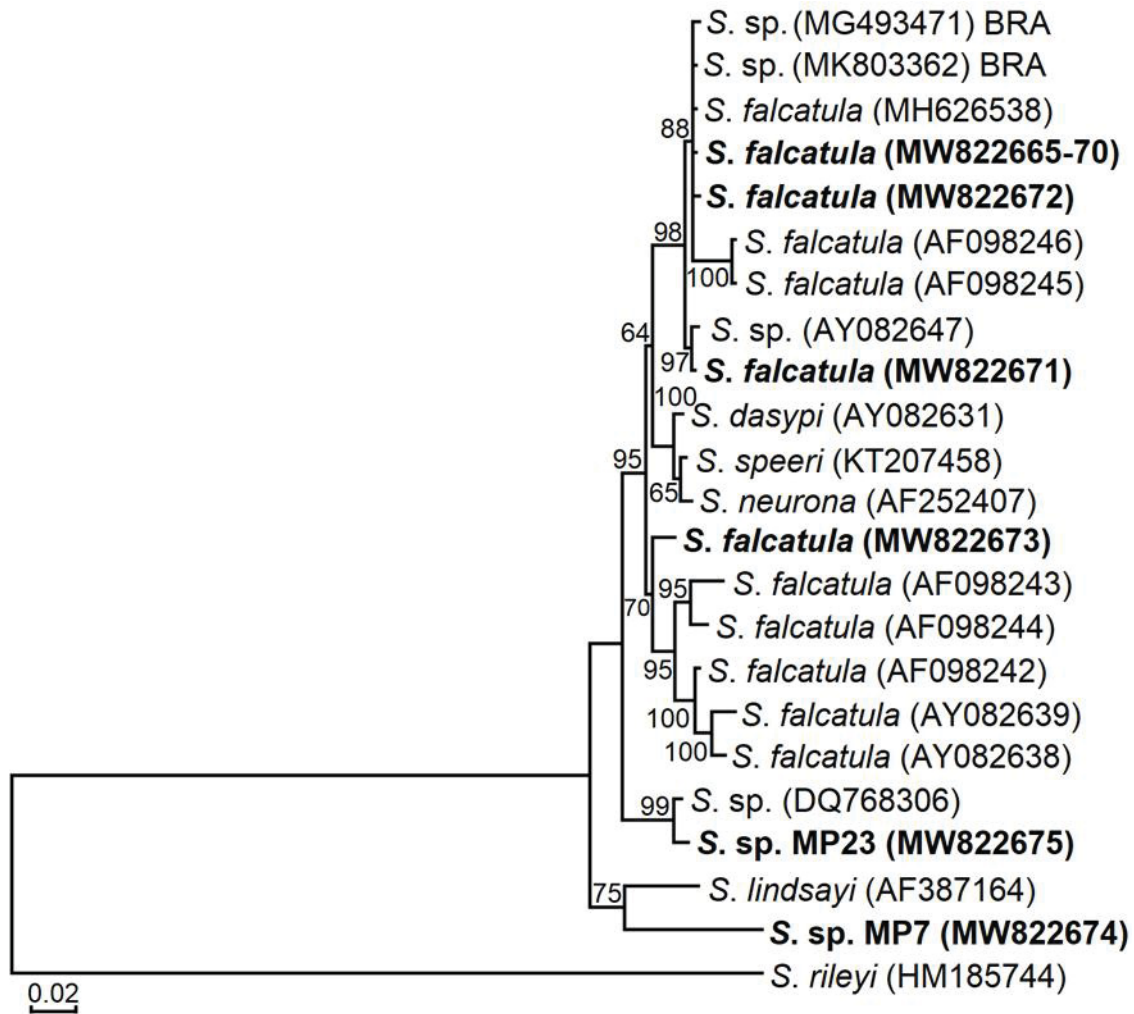


Fig. 1. The phylogenetic tree of selected *Sarcocystis* species based on ITS1 sequences and rooted on *Sarcocystis rileyi*. The final alignment contained 23 sequences and 774 nucleotide positions. HKY+G evolutionary model was set for analysis. Sequences obtained in the present study are in bold type. BRA – Brazil.

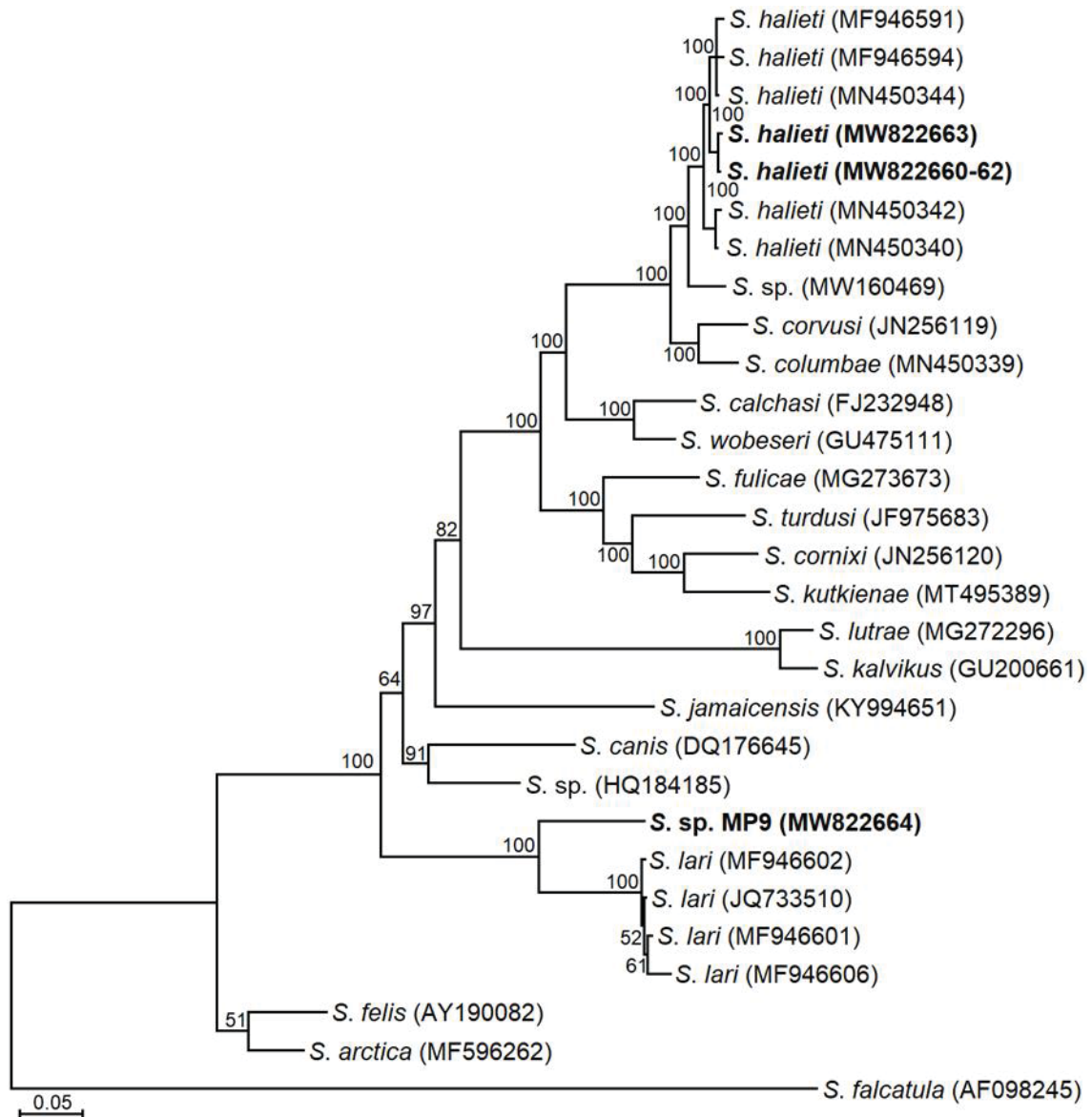


Fig. 2. The phylogenetic tree of selected *Sarcocystis* species based on ITS1 sequences and rooted on *Sarcocystis falcatula*. The final alignment contained 29 sequences and 1208 nucleotide positions. HKY+G evolutionary model was set for analysis. Sequences obtained in the present study are in bold type.

4.3.3 Histology

In the macroscopic evaluation, no lesions or cysts were observed in any of the seabirds. Microscopic findings in samples positive for *Sarcocystis* spp. were observed in the brain and in the pectoral muscles. In the brain, discrete to moderate congestion and moderate multifocal demyelination in the white matter of the cerebellum was

observed in two Kelp Gulls positive for *S. halioti*. In the pectoral muscles, discrete to moderate congestion and mild focal myositis were observed in two kelp gulls and one brown booby positive for *S. falcatula*. Microscopically visible cysts were detected in four pectoral muscles and in one heart. Structurally, sarcocysts are classified into two groups based on sarcocyst wall thickness. Thin-walled sarcocysts ($\leq 1 \mu\text{m}$) corresponding to *S. halioti* were found in pectoral muscles of one neotropic cormorant (Fig. 3). Thick-walled sarcocysts ($\geq 2 \mu\text{m}$) corresponding to *S. falcatula* were found in pectoral muscles of three brown boobies. In one Brown booby, thick-walled sarcocysts were seen in both pectoral and cardiac muscles (Fig. 4 A, B).

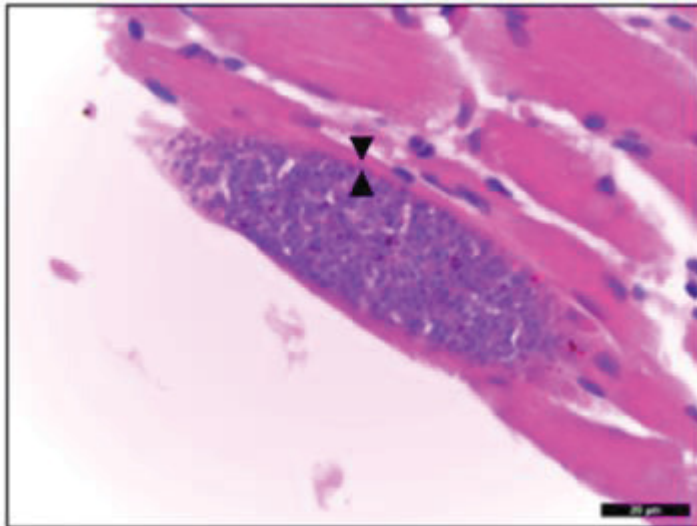


Fig.3. Histological tissue sections of pectoral muscle from neotropic cormorant (*Phalacrocorax brasilianus*). Longitudinal cut demonstrating thin walled *Sarcocysts* ($\leq 1\mu\text{m}$ - arrowhead) corresponding *S. halioti*. H&E. Bar: 20 μm .

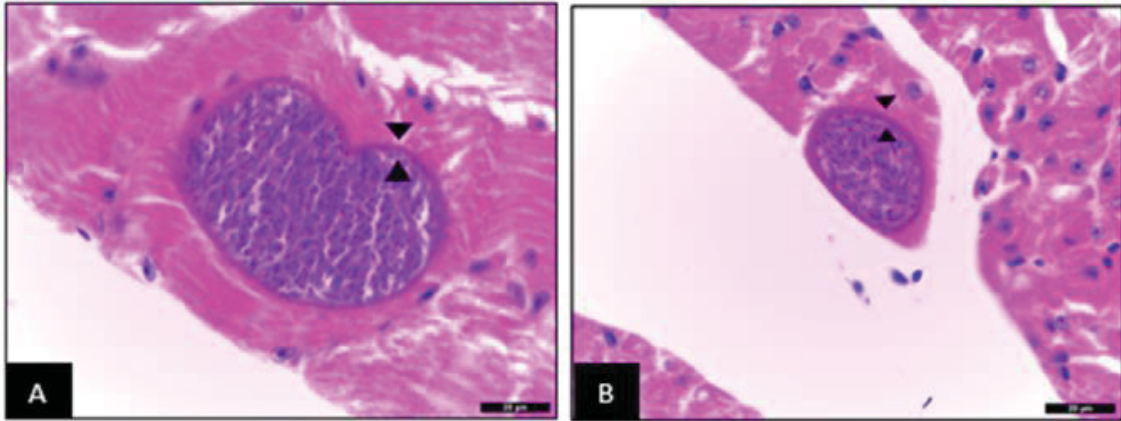


Fig. 4. (A, B) Histological tissue sections of pectoral muscle (A) and histological tissue sections of heart muscle (B) from one brown booby (*Sula leucogaster*). Transversal cut demonstrating thick walled sarcocysts ($\geq 2 \mu\text{m}$ - arrowhead) corresponding *S. falcatula*. H&E. Bar: 20 μm .

4.4 DISCUSSION

Four sequences obtained (MW822660–MW822663) from the pectoral muscles of neotropic cormorant and Manx Shearwater, and from the brain of a kelp gull were assigned to *S. halioti* (Table 2). This is the first confirmation of *S. halioti* in seabirds from South America. Previous studies detected Sarcocysts of *S. halioti* in Europe. The parasite was identified in the leg and neck muscles of great cormorant [25], in the leg muscles of herring gull [27], western marsh harrier (*Circus aeruginosus*), and black kite (*Milvus migrans*) [39] and in the breast and leg muscles of one common starling (*Sturnus vulgaris*) [40]. Encephalitis associated with *S. halioti* infection was recently reported in a free-ranging Little Owl (*Athene noctua*) from Germany [41]. *S. halioti* was also found in the intestinal samples of one white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) from Norway [42], three Eurasian sparrow hawks (*Accipiter nisus*) from Germany [43] and 48 birds belonging to four corvid species from Lithuania [44]. Recently the parasite was detected in red kite (*Milvus milvus*) intestine samples suggesting that this bird can act as a definitive host of this protozoa [40].

In Southern Chile a *Sarcocystis* sp. closely related to *S. halioti* DNA was identified in Chilean Skuas (*Stercorarius chilensis*) by means of nPCR-ITS1 [45] and recent reports in California and Brazil detected *S. halioti* in intestine and pectoral muscles samples of some raptor's species [46, 47].

We identified *S. falcatula* in nine tissue samples from brown booby, great skua, kelp gull (Charadriiformes) and neotropic cormorant (Suliformes). Phylogenetic

analysis indicates *S. falcatula* is a polyphyletic group (Fig. 1). Hence, we propose that *S. falcatula* should be considered a complex of species. Interestingly, the only isolate from the brain tissue was allocated to a different cluster than the other eight isolates derived from the pectoral and heart muscles. There is uncertainty in the literature regarding the identity of *S. falcatula*. Dubey et al. [9] concluded that *S. falcatula* constitutes a group of several species. Opossums are definitive hosts of four *Sarcocystis*, including *S. falcatula*. A single opossum species (*Didelphis virginiana*) inhabits North America, while five species of *Didelphis* are prevalent in South America (*D. albiventris*, *D. aurita*, *D. pernigra*, *D. imperfecta* and *D. marsupialis*) [48, 49]. The North American opossum serves as the definitive host for three *Sarcocystis* species, *S. falcatula*, *S. neurona* and *S. speeri*, whereas the South American opossums were confirmed as definitive hosts for *S. falcatula*, and *S. lindsayi* [48, 50, 51]. Both *Sarcocystis* species found in South America are infective to birds [50]. Most isolates of *Sarcocystis* spp. derived from opossums reported in Brazil were attributed to *S. falcatula*-like [52]. Studies performing molecular analysis with different genetic markers, in particular ITS1, verified that all these isolates differed from the known *Sarcocystis* spp. that use opossum as the definite host [33, 38, 48, 50]. The occurrence of four opossum species in Brazil (*D. albiventris*, *D. aurita*, *D. imperfecta* and *D. marsupialis*), and a large diversity of bird species probably contributes to the genetic differences observed in *Sarcocystis* spp. in Brazil [52]. Numerous avian species of different orders: Passeriformes, Psittaciformes, Columbiformes, Strigiformes and Falconiformes are susceptible to *S. falcatula* [38]. *Sarcocystis falcatula* infection has been reported to cause severe pulmonary and neurologic diseases in Old World Psittaciformes and Columbiformes [5]. Few studies have described *S. falcatula* infection in seabirds. By means of molecular methods, organisms closely related to *S. falcatula* were detected in magellanic penguins, although infected birds did not show clinical signs [33]. A fatal pneumonia associated with *S. falcatula* was reported in two penguin species [29], and in Brandt's cormorant [28]. To the best of our knowledge, this is the first report of *S. falcatula* in birds of the order Charadriiformes. Recently, an extensive survey of *Sarcocystis* spp. in wild birds in Brazil had shown molecular evidence of natural *S. falcatula* infection in 14 birds's species with high genetic diversity of *S. falcatula* [47].

Based on ITS1 sequence analysis, *Sarcocystis* sp. MP9 from kelp gull, *Sarcocystis* sp. MP7 from kelp gull and *Sarcocystis* sp. MP23 from neotropic cormorant

represent three previously undescribed *Sarcocystis* species. Phylogenetic analysis showed that *Sarcocystis* sp. MP9 from kelp gull is a sister species to *S. lari* (Fig. 2), previously identified in two gull species [24, 27]. By molecular methods *S. lari* was confirmed in the intestine of a white-tailed sea eagle from Norway [42] and in the intestines of members of the family Corvidae from Lithuania [44]. *Sarcocystis* sp. MP9 from kelp gull was also closely related to *S. calchasi*, *S. columbae*, *S. cornixi*, *S. haliyeti*, and *S. turdusi* whose definitive hosts are birds of prey [20, 42, 43, 46, 53]. The ITS1 sequence of *Sarcocystis* sp. MP23 from neotropic cormorant showed 98.7% similarity with *Sarcocystis* sp. (DQ768306) from the African grey parrot from Costa Rica [37] and with *Sarcocystis* sp. (KP871747) from *Didelphis* sp. from Brazil [38]. *Sarcocystis* sp. from the African grey parrot had grossly visible sarcocysts and by 18S rDNA and ITS1 showed close relationship to *Sarcocystis* spp. shed by opossums [37]. Also, *Sarcocystis* sp. MP7 from kelp gull displayed the highest similarity with *Sarcocystis* spp. using opossums as definitive hosts. Further investigation is necessary for conclusive confirmation of whether opossums are involved in the transmission of *Sarcocystis* sp. MP23 from neotropic cormorant and *Sarcocystis* sp. MP7 from kelp gull.

Our study detected three genetically different *Sarcocystis* species in neotropic cormorant (*S. haliyeti*, *S. falcatula* and *Sarcocystis* sp. MP23) and four species in kelp gull (*S. haliyeti*, *S. falcatula*, *Sarcocystis* sp. MP7, and *Sarcocystis* sp. MP9). Based on ITS1 sequence comparison, four morphologically indistinguishable species of *Sarcocystis* were identified in herring gull from Lithuania [27]. Perhaps a limitation of the present study is the molecular characterization of *Sarcocystis* species using a single locus. Although the ITS1 has been proven to be suitable marker for the species identification, other genetic loci as 18S rDNA, 28S rDNA and *cox1* could support the designation of the new species [4, 25]. To the best of our knowledge, there is no evidence that bird species can act as intermediate hosts for more than four *Sarcocystis* species. The great diversity of *Sarcocystis* species observed in two gull species might be associated with a wide range and variety of feeding habitats of these birds [54].

The structure and thickness of the sarcocyst wall varies between *Sarcocystis* species. The sarcocyst wall type and other morphological data have been reported in almost all avian species, but they are insufficient to complete their species identification and molecular analysis is necessary [9]. In the present study, birds were not examined for parasites under light microscopy and sarcocysts were not individually excised.

Histologic examination of H&E-stained muscle is a very common methodology to study sarcocyst morphology, however, this method is not as sensitive as the other methods such as examination of unstained squashes, and usually underestimate the prevalence of infection because only a small proportion of muscle can be examined [9, 55].

The microscopic findings as discrete to moderate congestion and moderate multifocal demyelination in the white matter of the cerebellum and mild focal myositis although non-specific, concur with some changes described in infections by *Sarcocystis* spp. [28,41]. Further detailed histopathological examinations in more seabirds are needed to evaluate pathogenicity of these *Sarcocystis* species.

Most seabirds positive for *Sarcocystis* spp. were adult and male. Some serological surveys performed in wild birds, have shown that seroprevalence to *Sarcocystis* spp. is age-related, with higher seroprevalences in older birds [56, 57]. Studies into the prevalence of *Sarcocystis* spp. in raptors revealed a higher prevalence in adult birds, suggesting a lack of exposure to sporocysts in young birds until they have matured and left the nest [55].

4.5 CONCLUSIONS

This study provides important evidence on the variety of *Sarcocystis* species found in seabirds. *S. falcatula* was confirmed in three Charadriiformes and one Suliforme species. *S. halioti* was found in two Charadriiformes, one Suliforme and one Procellariiforme. Furthermore, three genetically different *Sarcocystis* species were identified. Further research into the impact of observed *Sarcocystis* spp. on the health of seabirds is needed.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

This study was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Acknowledgements

We would like to thank the beach monitoring project team - Santos Basin (PMP-BS) in the Santa Catarina / Paraná (SC / PR) for the support and assistance during the sampling procedures and to the Histopathological Technical Center of Curitiba for their work in the making of histopathology slides.

REFERENCES

- [1] P. Prakas, D. Butkauskas, Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania, *Ekologija*. 58(2012) 45–58.
<https://doi.org/10.6001/ekologija.v58i1.2349>
- [2] B. Gjerde, T.D. Josefsen, Molecular characterisation of *Sarcocystis lutrae* n. sp. and *Toxoplasma gondii* from the musculature of two Eurasian otters (*Lutra lutra*) in Norway, *Parasitol. Res.* 114(2014) 873–886.
<https://doi.org/10.1007/s00436-014-4251-8>
- [3] T. Shadbolt, A. Pocknell, A.W. Sainsbury, S. Egerton-Read, D.P. Blake, Molecular identification of *Sarcocystis wobeseri*-like parasites in a new intermediate host species, the white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*), *Parasitol. Res.* 120 (2021) 1845-1850. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07103-0>
- [4] O. Máca, D. González-Solís, *Sarcocystis cristata* sp. nov. (Apicomplexa, Sarcocystidae) in the imported great blue turaco *Corythaeola cristata* (Aves, Musophagidae), *Parasites Vectors* 14(2021) 56.
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04553-w>
- [5] A. Wünschmann, D. Rejmanek, L. Cruz-Martinez, B.C. Barr, *Sarcocystis falcatula*-associated encephalitis in a free-ranging great horned owl (*Bubo virginianus*), *J. Vet. Diagn. Invest.* 21(2009) 283–287.
<https://doi.org/10.1177/104063870902100223>
- [6] G. Rimoldi, B. Speer, J.F. Wellehan Jr., D.S. Bradway, L. Wright, D. Reavill, B.C. Barr, A. Childress, H.L. Shivaprasad, R.P. Chin, An outbreak of *Sarcocystis calchasi* encephalitis in multiple psittacine species within an enclosed zoological aviary, *J. Vet. Diagn. Investig.* 25 (2013) 775–781.
<https://doi.org/10.1177/1040638713502981>

- [7] P. Olias, K. Maier, A. Wuenschmann, L. Reed, A.G. Armien, D.P. Shaw, A.D. Gruber, M. Lierz, *Sarcocystis calchasi* has an expanded host range and induces neurological disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) and North American rock pigeons (*Columbia livia f. dom*), *Vet. Parasitol.* 200 (2014) 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.012>
- [8] K. Maier, P. Olias, D. Enderlein, R. Klopffleisch, S.L. Mayr, A.D. Gruber, M. Lierz, Parasite distribution and early-stage encephalitis in *Sarcocystis calchasi* infections in domestic pigeons (*Columba livia f. domestica*). *Avian Pathol.* 44(2015), 5–12. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.978263>
- [9] J.P. Dubey, R. Calero-Bernal, B.M. Rosenthal, C.A. Speer, R. Fayer, *Sarcocystosis of animals and humans*, second ed. CRC Press, Boca Raton, 2016.
- [10] S.N. Godoy, C.D. de Paula, Z.S. Cubas, E.R. Matushima, J.L. Catão-Dias, Occurrence of *Sarcocystis falcatula* in captive psittacine birds in Brazil, *J. Avian Med. Surg.* 23(2009) 18–23. <https://doi.org/10.1647/2008-006R.1>
- [11] A. Wünschmann, D. Rejmanek, P.A. Conrad, N. Hall, L. Cruz-Martinez, S.B. Vaughn, B.C. Barr, Natural fatal *Sarcocystis falcatula* infections in free-ranging eagles in North America, *J. Vet. Diagn. Invest.* 22(2010) 282–289. <https://doi.org/10.1177/104063871002200222>
- [12] S. C. Votier, R. B. Sherley, Seabirds. *Curr. Biol.* 27(2017) R448–R450. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.042>
- [13] L.T. Ballance, Understanding seabirds at sea: Why and how? *Mar. Ornithol.* 35 (2007) 127–135.
- [14] M. L. Mallory, S.A. Robinson, C. E. Hebert, M. R. Forbes, Seabirds as indicators of aquatic ecosystem conditions: a case for gathering multiple proxies of seabird health, *Mar. Pollut. Bull.* 60(2010) 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.08.024>
- [15] A.M.R.N. de Matos, C. Domit, A.P.F.R.L. Bracarense, Seabirds: Studies with parasitofauna and potential indicator for environmental anthropogenic impacts. *Semin Cienc Agrar.* 41(2020) 1439–1450. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n4p1439>
- [16] T.E. Drouin, J.L. Mahrt, The prevalence of *Sarcocystis* Lankester, 1882, in some bird species in western Canada, with notes on its life cycle, *Can. J. Zool.* 57(1979) 1915–1921. <https://doi.org/10.1139/z79-254>
- [17] B.L. Munday, W.J. Hartley, K.E. Harrigan, P.J.A. Presidente, D.L. Obendorf, *Sarcocystis* and related organisms in Australian wildlife: II. Survey findings in birds, reptiles, amphibians and fish, *J. Wildl. Dis.* 15(1979) 57–73. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-15.1.57>

- [18] S.M. Pak, N.V. Eshtokina, Sarcosporidians of birds, in: Panin, V.J., (Ed.), Sarcosporidians of animals in Kazakhstan. Nauka, Almaty, 1984, pp. 150–168.
- [19] L.M. Pinayeva, C.M. Pak, L.I. Kokhno, *Sarcocystis* of the wild birds of Kazakhstan, Parasitol. Int. 47(1998) 143. [https://doi.org/10.1016/s1383-5769\(98\)80328-0](https://doi.org/10.1016/s1383-5769(98)80328-0)
- [20] P. Olias, A.D. Gruber, H.M. Hafez, A.O. Heydorn, H. Mehlhorn, M. Lierz, *Sarcocystis calchasi* sp. nov. of the domestic pigeon (*Columba livia* f. domestica) and the northern goshawk (*Accipiter gentilis*): light and electron microscopical characteristics. Parasitol. Res. 106(2010) 577–585. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1701-9>
- [21] P. Prakas, L. Kutkienė, D. Butkauskas, A. Sruoga, M. Žalakevičius, Molecular and morphological investigations of *Sarcocystis corvusi* sp. nov from the jackdaw (*Corvus monedula*). Parasitol. Res. 112(2013) 1163–1167. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3247-5>
- [22] A. El-Morsey, M. EL-Seify, A.Y. Desouky, M.M. Abdel-Aziz, H. Sakai, T. Yanai, *Sarcocystis chloropusae* (protozoa: Sarcocystidae) n. sp. from the common moorhen (*Gallinula chloropus*) from Egypt, Parasitology. 142(2015) 1063–1065. <https://doi.org/10.1017/s0031182015000293>
- [23] P. Prakas, D. Butkauskas, S. Švažas, E. Juozaitytė-Ngugu, V. Stanevičius, Morphologic and genetic identification of *Sarcocystis fulicae* n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the eurasian coot (*Fulica atra*), J. Wildl. Dis. 54(2018) 765–771. <https://doi.org/10.7589/2017-11-279>
- [24] P. Prakas, L. Kutkienė, D. Butkauskas, A. Sruoga, M. Žalakevičius, Description of *Sarcocystis lari* sp. n. (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the great black-backed gull, *Larus marinus* (Charadriiformes: Laridae), on the basis of cyst morphology and molecular data, Folia Parasitol. 61(2014) 11–17. <https://doi.org/10.14411/fp.2014.002>
- [25] P. Prakas, D. Butkauskas, S. Švažas, V. Stanevičius, Morphological and genetic characterisation of *Sarcocystis halioti* from the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), Parasitol. Res. 117(2018b) 3663–3667. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6083-4>
- [26] P. Prakas, L. Kutkienė, A. Sruoga, D. Butkauskas, *Sarcocystis* sp. from the herring gull (*Larus argentatus*) identity to *Sarcocystis wobeseri* based on cyst morphology and DNA results, Parasitol. Res. 109(2011) 1603–1608. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2421-5>
- [27] P. Prakas, D. Butkauskas, E. Juozaitytė-Ngugu, Molecular identification of four *Sarcocystis* species in the herring gull, *Larus argentatus*, from Lithuania, Parasites Vectors 13(2020) 2. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3869-x>
- [28] O. E. Bamac, K. H. Rogers, D. Arranz-Solís, J.P.J. Saeij, S. Lewis, R. Duerr, J. Skoglund, L. Peronne, A. Mete, Protozoal encephalitis associated with

- Sarcocystis calchasi* and *S. falcatula* during an epizootic involving Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in coastal Southern California, USA, *Int. J. Parasitol. Parasites. Wildl.* 12(2020) 185–19.
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.06.005>
- [29] S.G.M. Kirejczyk, R.E. Burns, M.W. Hyatt, M.J. Yabsley, J.M. Ter Beest, Z.S. Gyimesi, R.J. Ossiboff, A. Waltman, T.A. Seimon, R. McManamon, Fatal *Sarcocystis falcatula* infection in three Penguins, *Front. Vet. Sci.* 6(2019) 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00340>
- [30] K.D. Hyrenbach, Plumage-based ageing criteria for the Black-footed Albatross *Phoebastria nigripes*, *Mar. Ornithol.* 30(2002) 85–93
- [31] D.S. Lindsay, P.C. Smith, F. J. Hoerr, B.L. Blagburn. Prevalence of encysted *Toxoplasma gondii* in raptors from Alabama, *J. Parasitol.* 79(1993) 870-873.
<https://doi.org/10.2307/3283724>
- [32] R.M. Soares, E.G. Lopes, L.B. Keid, M.K. Sercundes, J. Martins, L.J. Richtzenhain, Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCRAP10) based on the *H. heydorni* RAPD fragment AP10, *Vet. Parasitol.* 175(2011) 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.022>
- [33] I.C.L. Acosta, R.M. Soares, L.F.S.P. Mayorga, B.F. Alves, H.S. Soares, S.M. Gennari, 2018. Occurrence of tissue cyst forming coccidia in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) rescued on the coast of Brazil, *PLoS One.* 13, e0212467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209007>
- [34] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215(1990) 403–10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- [35] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33(2016), 1870–1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- [36] I. Milne, F. Wright, G. Rowe, D. Marshall, D. Husmeier, G. McGuire, TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments, *Bioinformatics.* 20(2004) 1806–1807.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth155>
- [37] J. P. Dubey, B. Rosenthal, J. Morales, A. Alfaro Morphologic and genetic characterization of *Sarcocystis* sp. from the African grey parrot, *Psittacus erithacus*, from Costa Rica *Acta Parasitologica*, 51(2006) 161-168.
<https://doi.org/10.2478/s11686-006-0026-4>
- [38] S.Y. Valadas, J.I. da Silva, E.G. Lopes, L.B. Keid, T. Zwarg, A.S. de Oliveira, T.C. Sanches, A.M. Joppert, H.F. Pena, T.M. Oliveira, H.L. Ferreira, R.M. Soares, Diversity of *Sarcocystis* spp. shed by opossums in Brazil inferred with phylogenetic analysis of DNA coding ITS1, cytochrome B, and surface

- antigens, *Exp. Parasitol.* 164(2016), 71–78.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.02.008>
- [39] P. Prakas, A. Bea, E. Juozaitytė-Ngugu, I. Olano, D. Villanúa, S. Švažas, D. Butkauskas Molecular identification of *Sarcocystis halioti* in the muscles of two species of birds of prey from Spain, *Parasites Vectors* 14:414(2021) 1-7
<https://doi.org/10.1186/s13071-021-04921-0>
- [40] O. Máca, D. González-Sólis Role of three bird species in the life cycle of two *Sarcocystis* spp. (Apicomplexa, Sarcocystidae) in the Czech Republic. *Int. J. Parasitol.: Parasites Wildl.* 17(2022), 133-137.
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.01.002>
- [41] K. Maier-Sam, T. Kaiponen, A. Schmitz, C. Schulze, S. Bock, A. Hlinak, P. Olias, Encephalitis associated with *Sarcocystis halioti* infection in a free-ranging Little Owl (*Athene noctua*), *J. Wildl. Dis.* 57(3) (2021) 712-714
<https://doi.org/10.7589/JWD-D-20-00184>
- [42] B. Gjerde, T. Vikøren, I.S. Hamnes, Molecular identification of *Sarcocystis halioti* n. sp., *Sarcocystis lari* and *Sarcocystis truncata* in the intestine of a white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Norway, *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 7(2018) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.12.001>
- [43] S.L. Mayr, K. Maier, J. Müller, D. Enderlein, A.D. Gruber, M. Lierz, *Accipiter* hawks (Accipitridae) confirmed as definitive hosts of *Sarcocystis turdusi*, *Sarcocystis cornixi* and *Sarcocystis* sp. ex *Phalacrocorax carbo*, *Parasitol. Res.* 115(2016) 3041–3047. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5059-5>
- [44] E. Juozaitytė-Ngugu, S. Švažas, D. Šneideris, E. Rudaitytė-Lukošienė, D. Butkauskas, P. Prakas. The Role of Birds of the Family Corvidae in Transmitting *Sarcocystis* Protozoan Parasites Animals 11(2021) 3258.
<https://doi.org/10.3390/ani11113258>
- [45] I.C.L. Acosta, S.M. Gennari, A.B.L. Horwald, H.A.B. Llano, S. Muñoz-Leal, R.M. Soares, Molecular characterization of new haplotype of genus *Sarcocystis* in seabirds from Magdalena Island, Southern Chile, *Animals.* 11(2021) 245.
<https://doi.org/10.3390/ani11020245>
- [46] K.H. Rogers, D. Arranz-Solís, J. P.J Saeij, S. Lewis, A. Mete, *Sarcocystis calchasi* and other Sarcocystidae detected in predatory birds in California, USA. *Int. J. Parasitol.: Parasites Wildl.* 17(2022), 91-99.
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.12.008>
- [47] H.A.B. Llano, H. Z. Polato, L.B. Keid, T. M. F. de Souza Oliveira, T. Zwarg, A. S. de Oliveira, T. C. Sanches, A. M. Joppert, L. F.P. Gondim, R. M. Soares, Molecular screening for Sarcocystidae in muscles of wild birds from Brazil suggest a plethora of intermediate hosts for *Sarcocystis falcatula* *Int. J. Parasitol.: Parasites Wildl.* 17 (2022) 230-238.
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.03.002>

- [48] J.P. Dubey, C.A. Speer, D.D. Bowman, K.M. Horton, C. Venturini, L. Venturini, Experimental transmission of *Sarcocystis speeri* Dubey and lindsay, 1999 from the South American opossum (*Didelphis albiventris*) to the North American opossum (*Didelphis virginiana*), *J. Parasitol.* 86 (2000) 624-627. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0624:ETOSSD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0624:ETOSSD]2.0.CO;2)
- [49] R. Cerqueira, The Distribution of *Didelphis* in South America (Polyprotodontia, Didelphidae) *J. Biogeogr.* 12 (1085) 135-145. <https://doi.org/10.2307/2844837>
- [50] J.P. Dubey, B.M. Rosenthal, C.A. Speer, *Sarcocystis lindsayi* n. sp. (Protozoa:Sarcocystidae) from the South American opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil, *J. Eukaryot. Microbiol.* 48(2001), 595–603. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00196.x>
- [51] J.P. Dubey, S.K. Verma, D. Dunams, R. Calero-Bernal, B.M. Rosenthal, Molecular characterization and development of *Sarcocystis speeri* sarcocysts in gamma interferon gene knockout mice, *Parasitology* 142 (2015) 1555–1562. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001109>
- [52] L.F.P. Gondim, R. M. Soares, A. S. Tavaresa, W. Borges-Silva, R. F. de Jesus, H. A.B. Llano, L. Q. Gondim *Sarcocystis falcatula*-like derived from opossum in Northeastern Brazil: In vitro propagation in avian cells, molecular characterization and bioassay in birds, *Int. J. Parasitol.: Parasites Wildl.* 10 (2019) 132-137 <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.08.008>
- [53] P. Olias, L. Olias, M. Lierz, H. Mehlhorn, A.D. Gruber, *Sarcocystis calchasi* is distinct to *Sarcocystis columbae* sp. nov. from the wood pigeon (*Columba palumbus*) and *Sarcocystis* sp. from the sparrowhawk (*Accipiter nisus*), *Vet. Parasitol.* 171(2010) 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.021>.
- [54] O. Cabezón, M. Cerdà-Cuéllar, V. Morera, I. García-Bocanegra, J. González-Solís, S. Napp, M. P. Ribas, B. Blanch-Lázaro, X. Fernández-Aguilar, N. Antilles, S. López-Soria, C. Lorca-Oró, J. P. Dubey, & S. Almería, *Toxoplasma gondii* infection in seagull chicks is related to the consumption of freshwater food resources, *PLoS ONE*, 11 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150249>
- [55] A. R. Von Dohlen, D. Scott, J. P. Dubey, D. S. Lindsay, Prevalence of *Sarcocysts* in the muscles of raptors from a rehabilitation center in North Carolina, *J. Parasitol.* 105(2019) 11-16. <http://doi.org/10.1645/18-139>.
- [56] A.L. Konell, A.P. Sato, M. Stival, N.P. Malaguini, A.D. Anjos, R.F. Ferreira, R. Locatelli-Dittrich, Serosurvey of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* in geese (*Anser* sp.) from urban parks and captivity, *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 28(2019) 221–228. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019042>.

- [57] A.P. Sato, M.A. Goulart, A.L. Konell, M.O. Koch, F.M. Fonseca, A.P. Morel, R. Locatelli-Dittrich, Serosurvey of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in raptors and risk factor analysis. *Parasitol. Int.* 82(2021), 102312. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102312>.

5 CAPÍTULO IV - DIAGNÓSTICO MOLECULAR E HISTOPATOLÓGICO DE *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* E *Sarcocystis* spp. EM AVES SILVESTRES NO PARANÁ

RESUMO

As aves estão propensas a infecção por agentes infecciosos e parasitários de importância para a saúde pública e conservação ambiental. Os protozoários *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. são parasitos coccídeos formadores de cistos que infectam mamíferos, aves e répteis. O objetivo do presente estudo foi realizar o diagnóstico molecular e histopatológico de *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. em aves silvestres. No período de março de 2019 a março de 2021 foram coletadas amostras de tecidos (musculatura peitoral, coração e cérebro) de 63 aves silvestres no Paraná. Uma porção de cada tecido foi fixada em formalina tamponada a 10% para análise histopatológica enquanto o DNA foi extraído de outra porção para a análise molecular *nested* PCR (*nPCR*). Das 63 aves silvestres analisadas, 2 (3,17%) foram positivas na *nPCR* para *T. gondii* e 20 (31,7%) foram positivas para *Sarcocystis* spp. Não foi detectado DNA de *N. caninum*. Na microscopia foram identificados sarcocistos de parede fina ($\leq 1 \mu\text{m}$) e de parede espessa ($\geq 2 \mu\text{m}$). Com base na análise de sete sequências de ITS1, *T. gondii*, *S. falcatula* e *Sarcocystis* sp. foram detectados. DNA de *T. gondii* foi detectado em arará-canindé (*Ara ararauna*) e coruja-orelhuda (*Asio clamator*). DNA de *Sarcocystis* sp. foi detectado em cinco sabiás-laranjeiras (*Turdus rufiventris*), três tucanos-do-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*), duas corujinhas-do-mato (*Megascops choliba*), uma coruja-buraqueira (*Athene cunicularia*), um quiriquirei (*Falco sparverius*), um urubu-da-cabeça-preta (*Coragyps atratus*), uma marianinha-de-cabeça-amarela (*Pionites leucogaster*), uma garça-branca-grande (*Ardea alba*), e em um periquitão (*Psittacara leucophthalmus*). DNA de *S. falcatula* foi detectado em gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*), um gavião-de-coleira (*Falco femoralis*), um quero-quero (*Vanellus chilensis*) e em um periquito-de-encontro-amarelo (*Brotogeris chiriri*). Mais estudos moleculares são necessários para entender a epidemiologia destes protozoários e seu impacto na saúde das aves silvestres.

Palavras-chave: Toxoplasmose, *Sarcocystis falcatula*, ITS1, rapinantes, Passeriformes.

ABSTRACT

Birds are prone to infection by infectious agents and parasites of importance to public health and environmental conservation. The protozoans *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp. are cyst-forming coccidian parasites that infect mammals, birds, and reptiles. The aim of the present study was to carry out the molecular and histopathological diagnosis of *T. gondii*, *N. caninum* and *Sarcocystis* spp. in wild birds. From March 2019 to March 2021, tissue samples (pectoral muscles, heart and brain) were collected from 63 wild birds in Paraná. A portion of each tissue was fixed in 10% buffered formalin for histopathological analysis while DNA was extracted from another portion for molecular analysis (nested PCR -nPCR). Of the 63 wild birds analyzed, two (3.17%) were positive in nPCR for *T. gondii* and 20 (31.7%) were positive for *Sarcocystis* spp. *N. caninum* DNA was not detected. In the microscopy analysis, thin-walled ($\leq 1 \mu\text{m}$) and thick-walled ($\geq 2 \mu\text{m}$) sarcocysts were identified. Based on analysis of seven ITS1 sequences, *T. gondii*, *S. falcatula* and *Sarcocystis* sp. were detected. *T. gondii* DNA was detected in one blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*) and in one striped owl (*Asio clamator*). *Sarcocystis* sp. DNA was detected in five rufous-bellied thrushes (*Turdus rufiventris*), three red-breasted toucans (*Ramphastos dicolorus*), two tropical screech-owls (*Megascops choliba*), one burrowing owl (*Athene cunicularia*), one American kestrel (*Falco sparverius*), one black vulture (*Coragyps atratus*), one white-bellied parrot (*Pionites leucogaster*), one Western great egret (*Ardea alba*), and in one white-eyed parakeet (*Psittacara leucophthalmus*). DNA from *S. falcatula* has been detected in one roadside hawk (*Rupornis magnirostris*), one aplomado falcon (*Falco femoralis*), one Southern Lapwing (*Vanellus chilensis*) and in one yellow-chevroned parakeet (*Brotogeris chiriri*). Further molecular studies are needed to understand the epidemiology of these protozoa and their impact on wild bird health.

Key words: Toxoplasmosis, *Sarcocystis falcatula*, ITS1, raptors, passerines.

5.1 INTRODUÇÃO

Os protozoários *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. pertencem ao filo Apicomplexa e a família Sarcocystidae (TAYLOR *et al.*, 2017). São parasitos coccídeos formadores de cistos, possuem distribuição mundial e infectam mamíferos, aves e répteis. As aves se infectam pela ingestão de alimentos e água contaminados com esporocistos e oocistos esporulados, e por meio da ingestão de cistos em tecidos infectados (DONAHOE *et al.*, 2015; DUBEY, 2016; DUBEY, 2021).

A toxoplasmose é uma das mais importantes doenças parasitárias oportunistas que afetam seres humanos e animais em todo o mundo e é causada pelo parasito intracelular obrigatório *T. gondii* (LÓPEZ UREÑA *et al.*, 2022). Os gatos domésticos e os felídeos silvestres são os únicos hospedeiros definitivos de *T. gondii*, enquanto os seres humanos e uma grande variedade de animais, incluindo as aves são considerados hospedeiros intermediários (DUBEY, 2002; DUBEY, 2021). Estima-se que um terço da população é sorologicamente positiva e que 42-61% dos casos de toxoplasmose adquirida são de origem alimentar (ALVARADO-ESQUIVEL *et al.*, 2014; HALD *et al.*, 2016; AMOUIEI *et al.*, 2018). A gravidade da doença depende do estado imunológico do indivíduo, da suscetibilidade da espécie hospedeira, da virulência da cepa de *T. gondii*, da dose infectante e se os indivíduos foram infectados por meio do estágio de oocisto ou cisto tecidual (DUBEY, 2021).

As aves têm um papel significativo na epidemiologia da toxoplasmose e são consideradas importantes hospedeiras intermediárias deste protozoário, porque além de serem fonte de infecção para os felídeos, as espécies de aves que se alimentam no solo são consideradas sentinelas de contaminação ambiental com oocistos (LOSS *et al.*, 2013; GENNARI *et al.*, 2014). A presença de animais soropositivos em áreas livres de felídeos, como o Ártico e as ilhas oceânicas, tem sido atribuída às aves migratórias infectadas em outros lugares que chegam e entram na cadeia alimentar local (DEEM *et al.*, 2010; PRESTRUD *et al.*, 2007). A toxoplasmose clínica ocorre em uma ampla variedade de animais silvestres (DUBEY, 2021). Nas aves os sinais clínicos associados à toxoplasmose são diarreia, anorexia, desconforto respiratório e nas espécies mais susceptíveis, a doença pode ser letal (DUBEY, 2002; CAMPBELL *et al.*, 2022). O parasito *T. gondii* já foi isolado de várias espécies de aves silvestres em vários continentes, no entanto estudos com a avifauna brasileira são escassos (DUBEY, 2021).

A neosporose é uma doença infecciosa causada pelo parasita intracelular obrigatório *Neospora caninum*. A doença é reconhecida como uma das principais causas de aborto em bovinos (DONOHOE *et al.*, 2015; de BARROS *et al.*, 2018). Os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) e algumas espécies de canídeos selvagens como o dingo australiano (*Canis lupus dingo*), o coiote (*Canis latrans*) e o lobo cinzento (*Canis lupus*) são os hospedeiros definitivos deste parasito (MCALLISTER *et al.*, 1998; KINGS *et al.*, 2010; GONDIM *et al.*, 2004). Com base em dados de isolamento do parasito, e detecção de DNA e anticorpos, vários mamíferos domésticos e silvestres e algumas espécies de aves podem servir como hospedeiros intermediários (DUBEY; SHARES, 2007; DONAHOE *et al.*, 2015). Assim como *T. gondii*, *N. caninum* já foi relatado em vários animais silvestres ao redor do mundo (DUBEY *et al.*, 2011; DONOHOE *et al.*, 2015). As aves têm sido intensamente investigadas como possíveis hospedeiras intermediárias de *N. caninum* (de BARROS *et al.*, 2018). Muitos estudos sorológicos e moleculares foram conduzidos em aves domésticas (CAMILLO *et al.*, 2015) e em populações de aves silvestres (GONDIM *et al.*, 2010; MINEO *et al.*, 2011; DARWICH *et al.*, 2012; MOLINA-LOPEZ *et al.*, 2012) porém, o papel das aves no ciclo de vida do protozoário ainda não foi completamente elucidado (de BARROS *et al.*, 2018).

Os protozoários do gênero *Sarcocystis* são parasitos heteroxenos obrigatórios que infectam mamíferos, répteis e aves. O gênero possui mais de 210 espécies descritas, entretanto os ciclos de vida são conhecidos para menos de um quarto delas (DUBEY *et al.*, 2016; GONDIM *et al.*, 2021). A multiplicação assexuada do parasito com formação de cistos maduros ocorre na musculatura dos hospedeiros intermediários, que normalmente são animais onívoros, enquanto a fase sexuada com formação de oocistos/espocistos ocorre no intestino delgado dos hospedeiros definitivos, normalmente um animal carnívoro (GJERDE *et al.*, 2018). Entre as espécies de *Sarcocystis* que infectam mamíferos e as aves, duas utilizam gambás (*Didelphis* spp.) como hospedeiro definitivo, *Sarcocystis falcatula* que causa lesão pulmonar severa em aves (WUNSCHMANN *et al.*, 2009) e *Sarcocystis neurona* que causa meningoencefalite em cavalos (DUBEY *et al.*, 2015). Alguns estudos morfológicos e moleculares já foram conduzidos em aves na Europa e mais de 30 espécies de *Sarcocystis* foram identificadas, porém poucos estudos foram conduzidos para reconhecer a diversidade de *Sarcocystis* spp. nas aves no Brasil.

Considerando os impactos que estes protozoários podem causar e a escassez de literatura na investigação molecular e histopatológica o objetivo do presente trabalho foi realizar o diagnóstico molecular e histopatológico de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. em aves silvestres.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Aves

No período de março de 2019 a março de 2021, foram coletadas amostras de tecido (musculatura peitoral, coração e cérebro) de 63 aves silvestres. Das 63 aves, 17 eram de cativeiro provenientes do Parque das Aves (n:15) em Foz do Iguaçu e do Zoológico Municipal de Curitiba (n:2) e 46 eram de vida livre, provenientes de resgates feitos pelo Instituto Águas e Terras (IAT) em Curitiba e região metropolitana e Ecovia em Curitiba e litoral paranaense. A determinação da idade foi feita baseado na plumagem (GIACCARDI *et al.*, 1997). As aves morreram por diferentes causas e foram destinadas à necropsia no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná e no Laboratório de Patologia do Parque das aves. O sexo das aves foi determinado com base na observação das gônadas durante a necropsia (GRIFFITHS, 2000).

5.2.2 Histopatologia e coleta de amostras para *nested* PCR (*nPCR*)

Para o exame histopatológico, duas amostras medindo 0,4 × 0,8 cm foram coletadas do coração, músculo peitoral e cérebro e fixadas em formol tamponado a 10%. Após 24 horas as amostras foram processadas rotineiramente para análise histológica e foram incluídas em blocos de parafina, dos quais seções de 4,0 µm foram seccionadas, coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e montadas em lâminas histológicas. As lâminas foram examinadas em aumentos de 40 ×, 100 ×, 400 × e 1000 ×, usando um microscópio óptico DM500 (Leica, Wetzlar, Alemanha). Duas leituras

foram efetuadas. A primeira foi “cega” e a segunda orientada pelos resultados da técnica de PCR.

Uma porção de tecido (coração, músculo peitoral e cérebro) também foi coletada e armazenada a - 20 °C para análise molecular.

5.2.3 Digestão dos Tecidos

Antes da extração de DNA foi realizada a digestão péptica em 63 amostras da musculatura peitoral, 63 amostras do coração e 63 amostras do cérebro. Aproximadamente 3g dos tecidos (musculatura peitoral, pool de cérebro e coração), foram macerados e digeridos em 40 ml de solução de digestão contendo 1,3 g de pepsina, 3,5 ml de HCl e 2,5 g de NaCl em 500 ml de água destilada (LINDSAY *et al.*, 1993). Após a digestão, foi realizada a filtração (com gaze estéril) e lavagem da mistura (tecido digerido) com solução salina NaCl 0,8 %. A solução foi centrifugada a 3.745 g durante 10 minutos, três vezes. O sedimento da última lavagem foi armazenado em eppendorf a - 20 °C para posterior extração de DNA.

5.2.4 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada nas 189 amostras de tecidos com o kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™, Waltham, MA, USA), seguindo o protocolo do fabricante. O DNA extraído e purificado, foi quantificado no aparelho “NanoDrop One” (Gibco BRL, Rockville, MD, USA). A extração de DNA do controle negativo (água ultrapura) foi realizada juntamente com as amostras de tecido a cada 15 reações.

5.2.5 Reação em cadeia da polimerase *nested* (nPCR)

A nPCR foi utilizada para a amplificação das sequências de DNA genômico de *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. com primers específicos que amplificam a região espaçadora transcrita interna 1 (ITS1) dos protozoários da família Sarcocystidae (SLAPETTA *et al.*, 2002; SOARES *et al.*, 2011). As sequências dos primers foram JS4 (CGAAATGGGAAGTTTTGTGAAC) e CT2c (CTGCAATTCACATTGCGTTTCGC) como primers externos e JS4b (AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG) e CT2b (TTGCGCGAGCCAAGACATC) como primers internos.

As reações de amplificação do DNA de *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 80 ng de DNA, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U/µl de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen®), 1 X buffer, 0,6 uM de cada primer e água ultrapura. Na segunda reação de amplificação, foi utilizada a mesma concentração de reagentes com 1 µL do produto da primeira reação. Os ciclos de amplificação da primeira e segunda reação consistiram em um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40s, de anelamento a 56°C por 30s e de extensão a 72°C por 30s, e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% 90 volts durante 90 minutos, com marcador de peso molecular Ladder 100 pb 500 µL (Ludwig Biotec, Bela Vista - Alvorada, RS, Brasil), corado com SYBR® Safe DNA gel staining (Invitrogen®, Waltham, MA, USA) e observados no transiluminador de ultravioleta e documentado por fotografia.

Amostras controle positivo de DNA de *T. gondii* (cepa RH) e de *N. caninum* (cepa NC-1) e *Sarcocystis neurona* (cepa SNR37) e controle negativo (água ultrapura) foram incluídas em todas as reações.

5.2.6 Sequenciamento Sanger

Os produtos das reações de PCR foram purificados enzimaticamente com Exol/SAP e marcados com BigDye v3.1 para marcação com terminadores fluorescentes (Gibco BRL, Rockville, MD, USA). Os produtos marcados foram

precipitados com 20% de acetato de amônio 7,5M e três volumes de etanol absoluto, e re-suspensos em 10 µL de HiDi-formamida. Essas amostras foram sequenciadas em Genetic Analyser 3500xL utilizando capilares de 50cm com polímero Pop7 com primers internos *forward* e *reverse*. Os eletroferogramas gerados foram convertidos em sequência de bases com o programa “Sequencing Analysis” v5.4 (Gibco BRL, Rockville, MD, USA).

As sequências produzidas foram analisadas e corrigidas por meio da análise do eletroferograma utilizando o software Geneious prime 2020.1 e depois foram comparadas com sequências homólogas depositadas no *Genbank*, no *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 nPCR – ITS1

No estudo foram analisadas amostras de tecidos de 63 aves silvestres das seguintes ordens taxonômicas: Passeriformes (n=18), Strigiformes (n=19), Falconiformes (n=3), Accipitriformes (n=1), Cathartiformes (n=1), Psittaciformes (n=10), Charadriiformes (n=1), Phoenicopteriformes (n=2), Pelecaniformes (n=2), Galliformes (n=2) e Piciformes (n=4). As espécies das aves silvestres estudadas estão descritas na tabela 1. Das 63 aves silvestres, 34 eram jovens e 29 eram adultas, sendo 41 machos e 22 fêmeas.

Tabela 1: Espécies e número de aves silvestres analisadas no estudo.

Ordem taxônomica Nome comum (espécie)	Número (n)
Passeriformes	18
Sabiá-laranjeira (<i>Turdus rufiventris</i>)	10
João-de-barro (<i>Furnarius rufus</i>)	8
Strigiformes	19
Corujinha-do-mato (<i>Megascops choliba</i>)	7
Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	7
Suindara (<i>Tyto furcata</i>)	3
Coruja-orelhuda (<i>Asio clamator</i>)	1
Mocho-diabo (<i>Asio stygius</i>)	1
Accipitriformes	1
Gavião-carijó (<i>Rupornis magnirostris</i>)	1
Falconiformes	3
Falcão-de-coleira (<i>Falco femoralis</i>)	1
Quiri-quiri (<i>Falco sparverius</i>)	1
Carcará (<i>Caracara plancus</i>)	1
Cathartiformes	1
Urubu-preto (<i>Coragyps atratus</i>)	1
Psittaciformes	10
Papagaio-do-peito-roxo (<i>Amazona vinacea</i>)	1
Periquito-de-encontro-amarelo (<i>Brotogeris chiriri</i>)	1
Periquitão (<i>Psittacara leucophthalmus</i>)	2
Jandaia-verdadeira (<i>Aratinga jandaya</i>)	1
Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	1
Arará-canindé (<i>Ara ararauna</i>)	1
Marianinha-de-cabeça-amarela (<i>Pionites leucogaster</i>)	1
Cuiú-cuiú (<i>Pionopsitta pileata</i>)	1
Papagaio-da-cara-roxa (<i>Amazona brasiliensis</i>)	1
Charadriiformes	1
Quero-quero (<i>Vanellus chilensis</i>)	1
Pelecaniformes	2
Socó-boi (<i>Tigrisoma lineatum</i>)	1
Garça-branca-grande (<i>Ardea alba</i>)	1
Piciformes	4
Pica-pau-do-campo (<i>Colaptes campestris</i>)	1
Tucano-do-bico-verde (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	3
Pinguim-de-magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	1
Galliformes	2
Jacutinga-de-garganta-azul (<i>Aburria cumanensis</i>)	1
Jacuguaçu (<i>Penelope obscura</i>)	1
Phoenicopteriformes	2
Flamingo-comum (<i>Phoenicopterus roseus</i>)	2

Das 63 aves silvestres analisadas, duas (3,17%) foram positivas para *T. gondii*. As duas amostras foram sequenciadas e apresentaram 98 – 100 % de identidade com outras sequências de *T. gondii* no *GenBank*. DNA de *T. gondii* foi detectado no coração de uma arará-canindé (*Ara ararauna*) e na musculatura peitoral de uma coruja-orelhuda (*Asio clamator*).

Vinte aves (31,7%) de 14 espécies foram positivas para *Sarcocystis* spp. DNA de *Sarcocystis* spp. foi detectado em cinco sabiás-laranjeiras (*Turdus rufiventris*), em três tucanos-do-bico-verde (*Ramphastos dicolorus*), duas corujinhas-do-mato (*Megascops choliba*), uma coruja-buraqueira (*Athene cunicularia*), um gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*), um quiri-quiri (*Falco sparverius*), um gavião-de-coleira (*Falco femoralis*), um urubu-da-cabeça-preta (*Coragyps atratus*), uma marianinha-de-cabeça-amarela (*Pionites leucogaster*), um quero-quero (*Vanellus chilensis*) um periquito-de-encontro-amarelo (*Brotogeris chiriri*), uma garça-branca-pequena (*Egretta thula*), e em um periquitão (*Psittacara leucophthalmus*). DNA de *Sarcocystis* spp. foi identificado na musculatura peitoral (19) e no coração (2). Os resultados da nPCR-ITS1 para *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. nos tecidos (musculatura peitoral, coração e cérebro) e cisto no exame histopatológico das aves estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2: Resultado da nPCR-ITS1 para *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. nos tecidos (musculatura peitoral, coração e cérebro) e cisto no exame histopatológico das aves.

Nome comum (nome científico)	nPCR <i>T. gondii</i>			nPCR <i>Sarcocystis</i> spp			Cisto no exame histopatológico		
	MP*	CO*	C*	MP*	CO*	C*	MP*	CO*	C*
Arará-canindé (<i>Ara ararauna</i>)	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Coruja-orelhuda (<i>Asio clamator</i>)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sabiá-laranjeira (<i>Turdus rufiventris</i>)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Sabiá-laranjeira (<i>Turdus rufiventris</i>)	-	-	-	+	+	-	+	+	-
Sabiá-laranjeira (<i>Turdus rufiventris</i>)	-	-	-	+	+	-	+	-	-
Sabiá-laranjeira (<i>Turdus rufiventris</i>)	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Sabiá-laranjeira (<i>Turdus rufiventris</i>)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Tucano-do-bico-verde (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Tucano-do-bico-verde (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Tucano-do-bico-verde (<i>Ramphastos dicolorus</i>)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Corujinha-do-mato (<i>Megascops choliba</i>)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Corujinha-do-mato (<i>Megascops choliba</i>)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Gavião-carijó (<i>Rupornis magnirostris</i>)	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Quiri-quiri (<i>Falco sparverius</i>)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Falcão-de-coleira (<i>Falco femoralis</i>)	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Urubu-da-cabeça-preta (<i>Coragyps atratus</i>)	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Marianinha-de-cabeça-amarela (<i>Pionites leucogaster</i>)	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Quero-quero (<i>Vanellus chilensis</i>)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Periquito-de-encontro-amarelo (<i>Brotogeris chiriri</i>)	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Garça-branca-grande (<i>Ardea alba</i>)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Periquitão (<i>Psittacara leucophthalmus</i>)	-	-	-	+	+	-	+	+	-

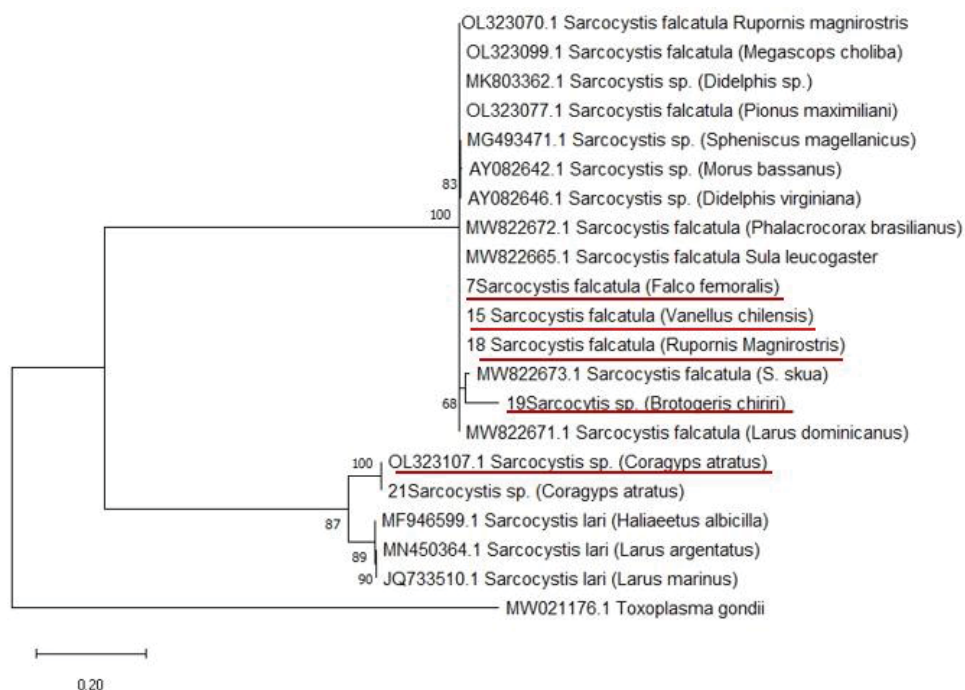
MP*: Musculatura peitoral, CO*: Coração, C*: Cérebro.

Dez amostras positivas para *Sarcocystis* spp. foram sequenciadas, porém não foi possível analisar cinco amostras devido à baixa qualidade do sequenciamento.

Das cinco analisadas, quatro apresentaram 90 – 100 % de identidade com sequências de *S. falcatula* e uma apresentou 90% de identidade com sequência de *S. lari* depositadas no Genbank. Com base na análise filogenética três isolados foram atribuídos a *S. falcatula* e dois a *Sarcocystis* sp. (Figura 1).

Nas amostras analisadas, o DNA de *N. caninum* não foi detectado e nem coinfeção entre os protozoários.

Figura 1. Arvore filogenética de espécies de *Sarcocystis* selecionadas com base nas sequências de ITS1 e enraizadas em *Toxoplasma gondii*. A história evolutiva foi inferida usando o método de máxima verossimilhança e o modelo Tamura-Nei em MEGA X. números acima ou abaixo dos nós representam valores de confiança de bootstrap de 500 réplicas.



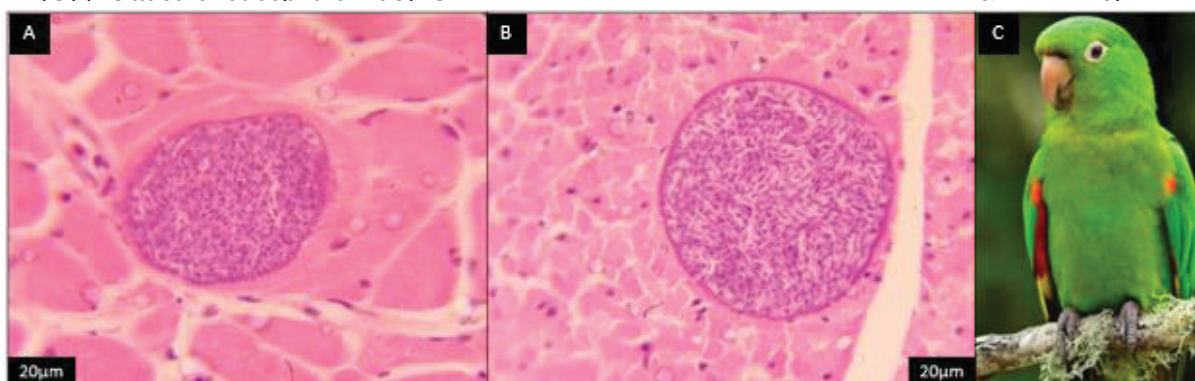
FONTE: Arquivo pessoal

5.3.2 Histopatologia

Na avaliação macroscópica, não foram observadas lesões ou cistos em nenhum tecido das aves. Na análise microscópica também não foram encontrados achados como infiltrado inflamatório e gliose nas amostras positivas para *T. gondii*. Estruturas parasitárias (cistos de protozoários Apicomplexa) foram observadas em três sabiás-laranjeiras, uma arara-canindé, em dois tucanos-de-bico-verde, um gavião-carijó, um gavião-de-coleira, em um urubu-da-cabeça-preta, em uma marianinha-da-cabeça-amarela, em um periquitão e em um periquito-do-encontro-amarelo (Figuras 1-6). Os cistos microscopicamente visíveis foram detectados em 12 amostras de músculos peitorais e em dois corações.

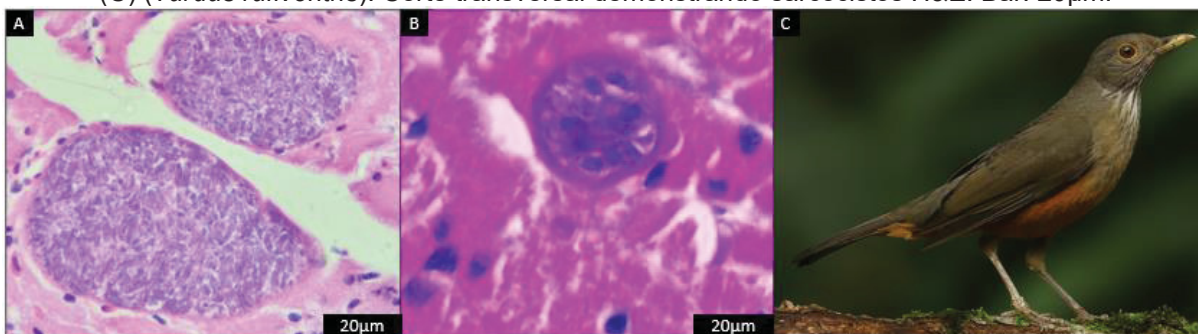
Estruturalmente, os sarcocistos foram classificados em dois grupos com base na espessura da parede do sarcocisto. Sarcocistos de paredes finas ($\leq 1 \mu\text{m}$) foram encontrados na musculatura peitoral de um urubu-da-cabeça-preta (*Coragyps atratus*) (Figura 9). Sarcocistos com paredes mais espessas ($\geq 2 \mu\text{m}$) e protusões na parede foram encontrados no músculo cardíaco de um periquitão (*Psittacara leucophthalmus*) (Figura 10).

Figura 1 Secção de tecido histológico do músculo peitoral (A) e cardíaco (B) da ave periquitão (C) (*Psittacara leucophthalmus*). Corte transversal demonstrando sarcocistos H&E. Bar: 20 μm .



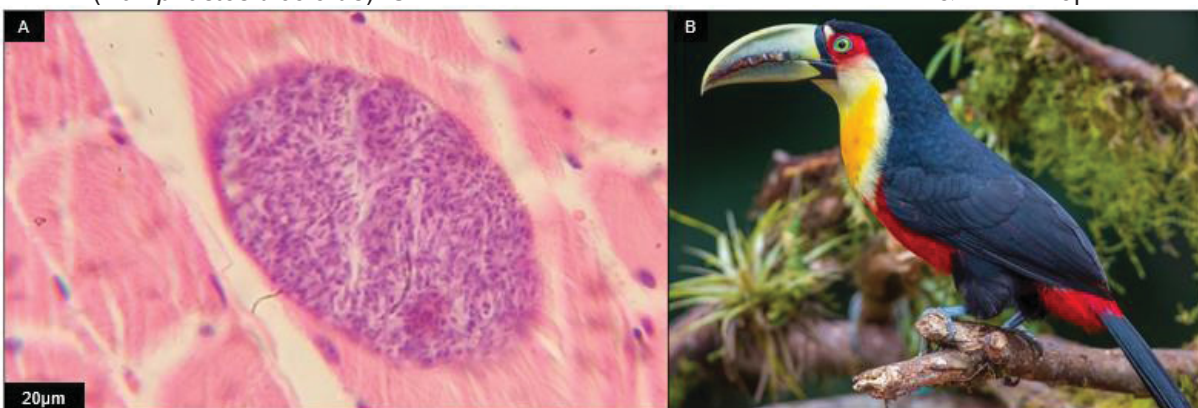
FONTE: Imagem A e B: Arquivo pessoal - Imagem C: Jarbas Mattos (WikiAves)

Figura 2: Secção de tecido histológico do músculo peitoral (A) e cardíaco (B) da ave sabiá-laranjeira (C) (*Turdus rufiventris*). Corte transversal demonstrando sarcocistos H&E. Bar: 20µm.



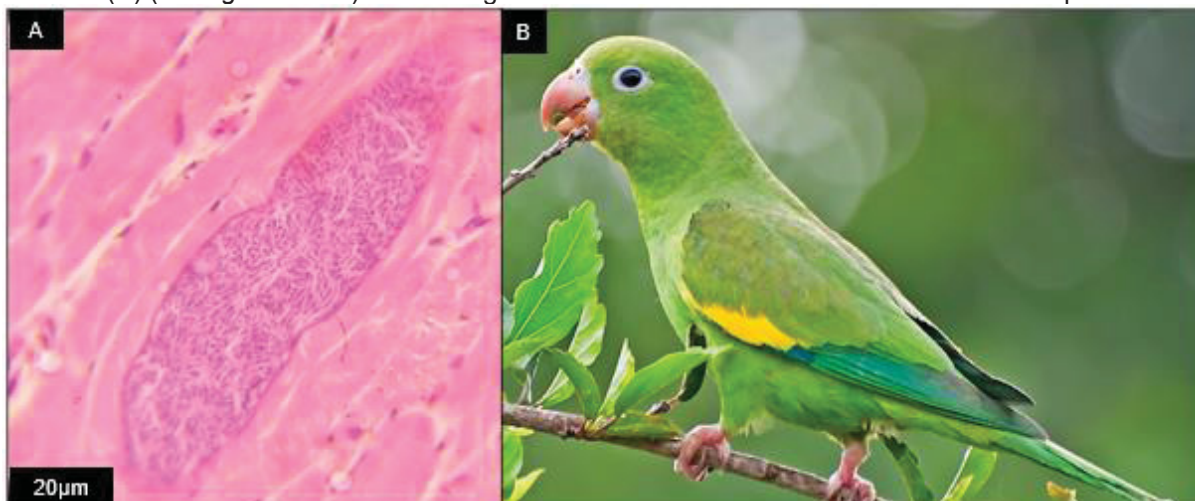
FONTE: Imagem A e B: Arquivo pessoal - Imagem C: Leonardo Casadei (WikiAves)

Figura 3: Secção de tecido histológico do músculo peitoral (A) da ave tucano-de-bico-verde (B) (*Ramphastos dicolorus*). Corte transversal demonstrando sarcocistos H&E. Bar: 20µm.



FONTE: Imagem A: Arquivo pessoal - Imagem B: Marcelo Telles (WikiAves)

Figura 4: Secção de tecido histológico do músculo peitoral (A) da ave periquito-de-encontro-amarelo (B) (*Brotogeris chiriri*). Corte longitudinal demonstrando sarcocistos H&E. Bar: 20µm.



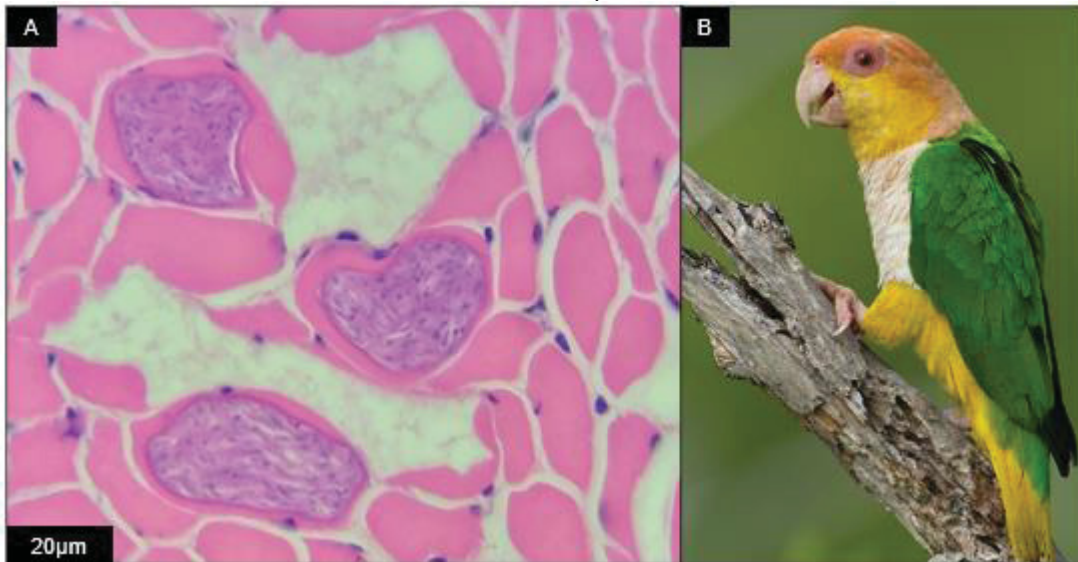
FONTE: Imagem A: Arquivo pessoal - Imagem B: Mariza Sanches (WikiAves)

Figura 5: Secção de tecido histológico do músculo peitoral (A) da ave gavião-carijó (B) (*Rupornis magnirostris*). Corte transversal demonstrando sarcocistos H&E. Bar: 20µm.



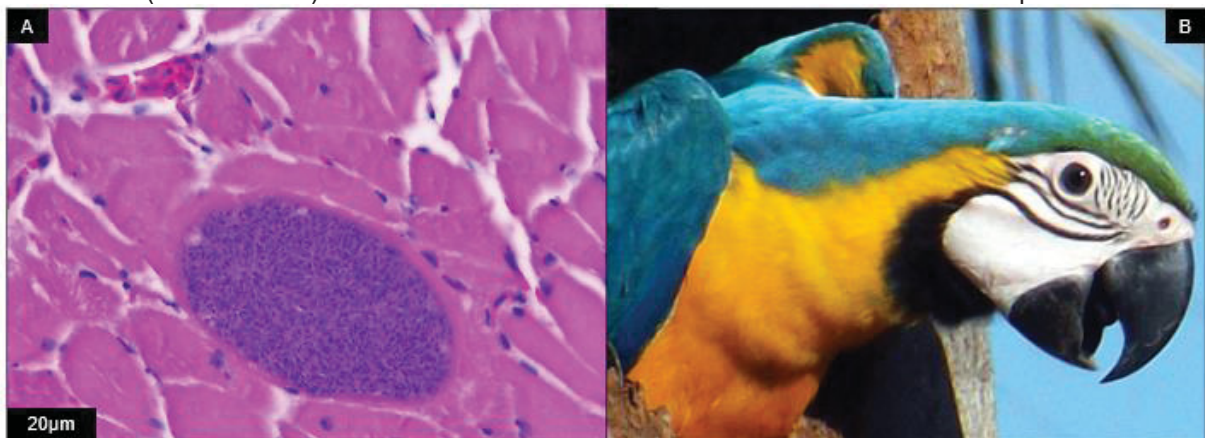
FONTE: Imagem A: Arquivo pessoal - Imagem B: Daniel Barbare (WikiAves)

Figura 6: Secção de tecido histológico do músculo peitoral (A) da ave marianinha-de-cabeça-amarela (B) (*Pionites leucogaster*). Corte transversal demonstrando sarcocistos H&E. Bar: 20µm.



FONTE: Imagem A: Arquivo pessoal - Imagem B: Ricardo Gentil (WikiAves)

Figura 7: Secção de tecido histológico do músculo peitoral (A) da ave arará-canindé (B) (*Ara ararauna*). Corte transversal demonstrando sarcocistos H&E. Bar: 20µm.



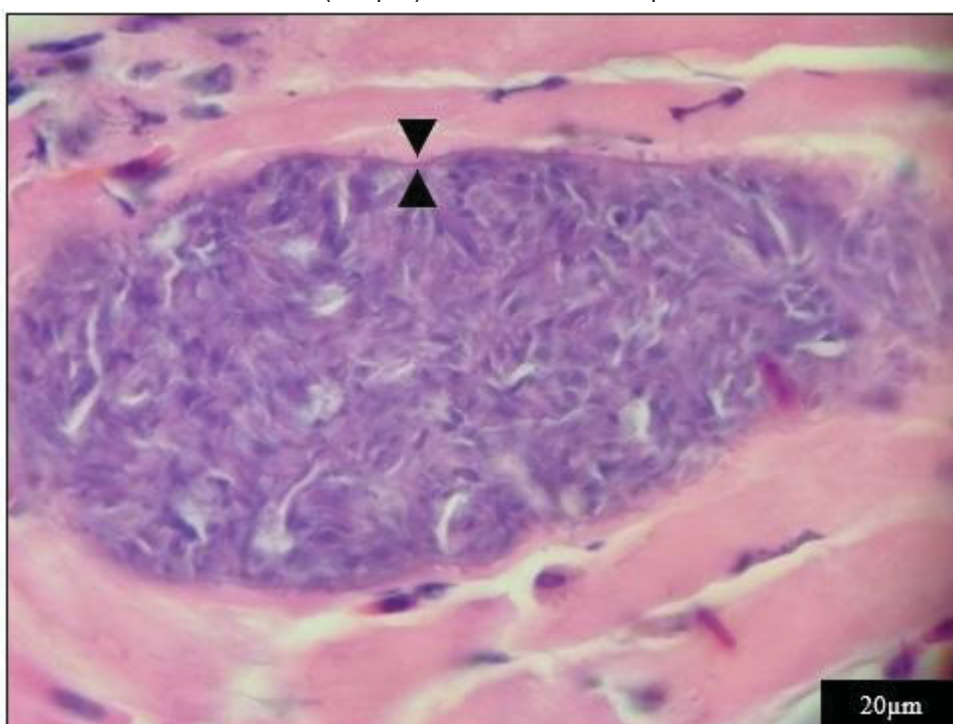
FONTE: Imagem A: Arquivo pessoal - Imagem B: Geancarlo Merighi (WikiAves)

Figura 8: Secção de tecido histológico do músculo peitoral (A) da ave urubu-da-cabeça-preta (B) (*Coragyps atratus*). Corte longitudinal demonstrando sarcocistos H&E. Bar: 20µm.



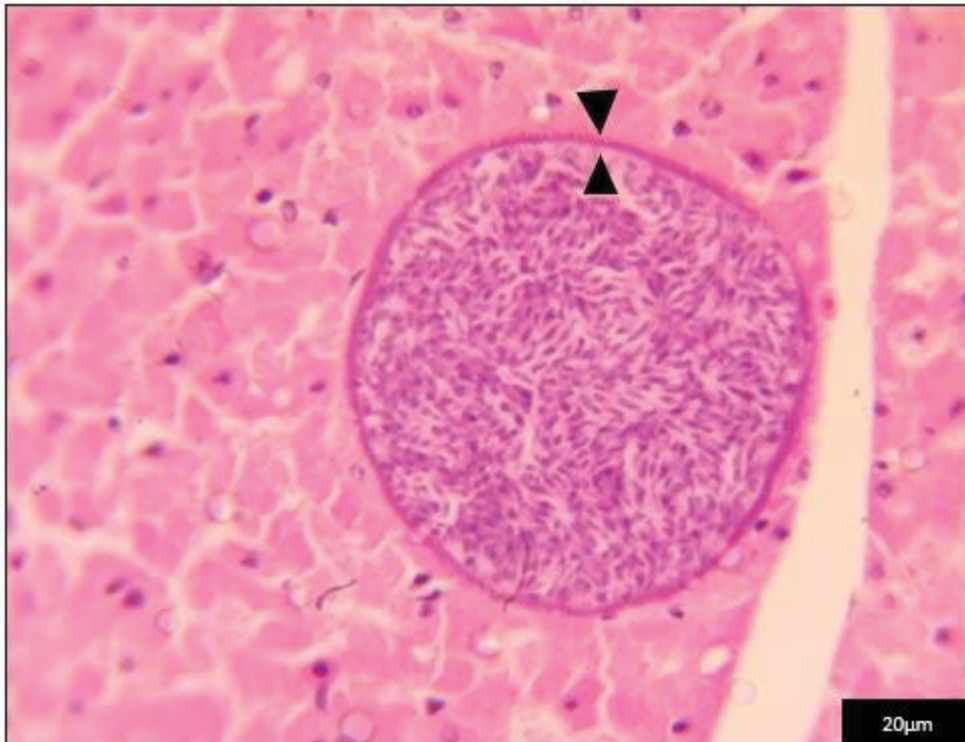
FONTE: Imagem A: Arquivo pessoal - Imagem B: David Steinwender (WikiAves)

Figura 9: Secção de tecido histológico do músculo peitoral de urubu-preto (*Coragyps atratus*). Corte longitudinal demonstrando sarcocisto de parede fina ($\leq 1 \mu\text{m}$) seta. H&E. Bar: 20µm.



FONTE: Arquivo pessoal

Figura 10: Secção de tecido histológico do músculo cardíaco da ave periquitão (*Psittacara leucophthalmus*). Corte transversal demonstrando sarcocisto de parede espessa ($\geq 2 \mu\text{m}$) seta e protusões na parede. H&E. Bar: 20 μm .



FONTE: Arquivo pessoal

5.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a presença de *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. em aves silvestres de várias ordens taxonômicas com a detecção de DNA dos dois protozoários em 3,17% e 31,7% das aves analisadas, respectivamente.

Estudos anteriores isolaram ou relataram a presença de *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. em tecidos de várias espécies de aves silvestres, embora a maioria das pesquisas tenha sido conduzida em *T. gondii* (DUBEY, 2002; DONAHOE *et al.*, 2015).

No presente estudo, DNA de *T. gondii* foi detectado no coração de uma arará-canindé (*Ara ararauna*) de cativeiro e na musculatura peitoral de uma coruja-orelhuda (*Asio clamator*) de vida livre. Dados da literatura demonstram diferentes taxas de detecção de DNA de *T. gondii* em diferentes espécies de aves silvestres. Darwich *et al.*, (2012) na Espanha, por meio de uma *nPCR* visando a repetição do fragmento de 529 bp de *T. gondii* em amostras de cérebro de 201 aves silvestres de 14 espécies, encontraram DNA de *T. gondii* no cérebro de 12 aves (6 %). Nardoni *et al.*, (2019) usando *nPCR* visando o gene B1, encontraram DNA de *T. gondii* nas amostras de cérebro e coração de vinte e cinco aves (11,6 %) na Itália. Um estudo na Turquia, detectou DNA de *T. gondii* por meio de PCR em tempo-real em 89,3 % das 43 aves de rapina investigadas (KARAKAVUK *et al.*, 2018). No Brasil, Silva *et al.*, (2018) utilizando PCR para detectar DNA de *T. gondii* em amostras de cérebro, coração e musculatura peitoral de 71 aves, encontraram DNA em 4,2 % uma baixa prevalência similar a porcentagem encontrada no presente estudo. Regô *et al.*, (2021) em Minas Gerais, detectaram DNA de *T. gondii* em 10 (22,7 %) das 44 aves silvestres estudadas e entre as espécies de aves deste estudo *T. gondii* foi identificado em uma coruja-orelhuda *Asio clamator*.

As diferenças encontradas nos valores nas taxas de detecção de DNA de *T. gondii* nas aves silvestres podem ser explicadas pela sensibilidade das diferentes técnicas moleculares utilizadas e também pelos diferentes comportamentos e dieta de determinada espécie de ave que faz com que elas podem estar expostas a um grau diferente de risco de infecção pelo protozoário (GAZONNIS *et al.*, 2021). Um estudo que avaliou a soroprevalência de *T. gondii* e fator de risco em várias espécies de aves silvestres na Espanha, demonstrou que as aves carnívoras são mais propensas a infecção (CABEZÓN *et al.*, 2012). Wilson *et al.*, 2020, avaliaram a prevalência de *T. gondii* em aves em um contexto ecológico e numa escala global e verificaram que a prevalência de *T. gondii* aumenta com o nível trófico das aves silvestres em ambiente terrestre.

No presente estudo não foi detectado DNA de *N. caninum* nas amostras de tecido das aves. Existem poucos relatos de infecções naturais por *N. caninum* em aves silvestres, e os poucos estudos demonstraram diferentes valores de taxas de detecção de DNA (de BARROS *et al.*, 2018). Gazzonis *et al.*, (2021) usando *nPCR* visando o gene Nc5, encontraram DNA de *N. caninum* em amostras de cérebro de duas aves de rapina já Lukášová *et al.*, (2016) investigando amostras de cérebro de

101 aves silvestres na África não detectaram DNA de *N. caninum* em nenhuma delas. No Brasil, Gondim *et al.*, (2010) demonstraram infecção por *N. caninum* em pardais (*Passer domesticus*). Este estudo foi o primeiro a mostrar que as aves silvestres podem atuar como hospedeiras intermediárias de *N. caninum* e contribuir no ciclo silvestre do parasito. Mineo *et al.*, (2011) na análise histopatológica descreveram a presença de cistos teciduais em uma arara-vermelha (*Ara chloropterus*) e em um papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) que na análise imunohistoquímica dessas amostras revelou imunocoloração com anticorpos policlonais de *N. caninum*.

Vinte aves silvestres (31,7%) de 14 espécies foram positivas para *Sarcocystis* spp. no presente estudo. Uma alta frequência quando comparado ao estudo de Regô *et al.*, (2020) e Alves *et al.*, (2022) que detectaram DNA de *Sarcocystis* spp. em 11,4% e em 4,62% aves, respectivamente. As aves silvestres podem ser hospedeiras definitivas e ou intermediárias de algumas espécies de *Sarcocystis* e são suscetíveis à infecção (DUBEY, 2016; MACA *et al.*, 2021; LLANO *et al.*, 2022). Nos últimos anos várias pesquisas de caracterização molecular de espécies de *Sarcocystis* em aves silvestres utilizando vários marcadores genéticos foram conduzidas principalmente na Europa (PRAKAS *et al.*, 2020; 2021; MACA *et al.*, 2021). No Brasil apesar da diversidade da avifauna estudos de investigação molecular desses protozoários são escassos.

Identificamos *Sarcocystis* sp. em nove amostras de tecidos de sabiá-laranjeira (*Turdus rufiventris*) com presença de sarcocistos na musculatura peitoral e cardíaca. Relatos de infecção natural por *Sarcocystis* spp. em passeriformes no Brasil são escassos. Kutkiené *et al.*, (2012) investigando 44 melros-preto (*Turdus merula*), encontraram cistos de *Sarcocystis* em 24 (54,5%) indivíduos e nomearam *Sarcocystis turdusi*. Mansfield *et al.*, (2008) confirmaram que o pássaro-vaqueiro-da-cabeça-marrom (*Molothrus ater*) atua como hospedeiro intermediário de *S. neurona*. Um estudo recente que investigou *Sarcocystis* spp. em 146 passeriformes no Brasil, detectou DNA de *Sarcocystis falcatula* em apenas oito indivíduos (LLANO *et al.*, 2022). A alta prevalência de *Sarcocystis* spp. no sabiá-laranjeira sugere que a infecção ocorreu por meio da ingestão de oocistos/ esporocistos no ambiente ou por ingestão de pequenos vertebrados que podem ser hospedeiros paratênicos de *Sarcocystis* spp. (CLUBB *et al.*, 1992). O sabiá-laranjeira é um passeriforme amplamente distribuído por todo o território brasileiro. São aves onívoras e

generalistas, muitas vezes se alimentam de frutas, sementes e também pequenos vertebrados (SABINO *et al.*, 2017).

No presente estudo, DNA de *Sarcocystis falcatula* foi detectado em psitacídeos e rapinantes. Vários estudos relataram a susceptibilidade de psitacídeos e rapinantes a infecção por *S. falcatula* (DUBEY, 2016). Os gambás são hospedeiros definitivos de quatro espécies de *Sarcocystis*, incluindo *S. falcatula*. Uma única espécie de gambá (*Didelphis virginiana*) habita a América do Norte, enquanto cinco espécies de *Didelphis* são predominantes na América do Sul (*D. albiventris*, *D. aurita*, *D. pernigra*, *D. imperfecta* e *D. marsupialis*) (CERQUEIRA, 1985; DUBEY *et al.*, 2000). O gambá norte-americano serve como hospedeiro definitivo para três espécies de *Sarcocystis*: *S. falcatula*, *S. neurona* e *S. speeri*, enquanto os gambás sul-americanos foram confirmados como hospedeiros definitivos de *S. falcatula* e *S. lindsayi* (DUBEY *et al.*, 2001, DUBEY *et al.*, 2015; GONDIM *et al.*, 2019). Ambas as espécies de *Sarcocystis* encontradas na América do Sul são infectantes para aves. Llano *et al.*, (2022) realizaram uma pesquisa para identificar espécies de *Sarcocystis* nas aves silvestres no Brasil. Com este levantamento, forneceram a primeira evidência molecular de infecção natural por *S. falcatula* em 14 espécies de aves com uma alta diversidade genética de *S. falcatula* em hospedeiros intermediários na América do Sul.

A infecção causada por *S. falcatula* pode propiciar doença clínica grave ou fatal em espécies de psitacídeos do Velho Mundo e aves de rapina (GODOY *et al.*, 2009) Sarcocistose associada a doença clínica está sendo cada vez mais relatada na América do Norte e Europa (RIMOLDI *et al.*, 2013; WÜNSCHMANN *et al.*, 2009). A exposição dos Psitacídeos ao protozoário pode ter ocorrido por meio da contaminação da ração com fezes de gambá e ou ingestão de pequenos vertebrados como baratas (VILLAR *et al.*, 2008; CLUBB, 1992). A exposição das aves de rapina ocorre por ingestão de presa infectada pelo protozoário. A contaminação da água por protozoários também já foi reconhecida como uma importante fonte de infecção.

No presente estudo, 12 aves silvestres apresentaram cisto de protozoários Apicomplexa na análise microscópica, 11 aves foram positivas na nPCR-ITS1 para *Sarcocystis* spp. Foram identificados sarcocistos com a parede mais fina e sarcocistos com a parede mais espessa e com presença de protusões. A estrutura e espessura da parede do sarcocisto varia entre as espécies de *Sarcocystis*. O tipo de parede do sarcocisto e outros dados morfológicos foram relatados em quase todas as espécies de aves, mas são insuficientes para completar a identificação das espécies e a análise

molecular é necessária (DUBEY, 2016). No presente estudo, os tecidos não foram examinados sob microscopia de luz previamente e os sarcocistos não foram excisados individualmente. O exame histológico do músculo corado com H&E é uma metodologia utilizada para estudar a morfologia dos cistos, no entanto, este método tem baixa sensibilidade quando comparado a outros métodos como microscopia eletrônica de varredura, e geralmente subestima a prevalência de infecção porque apenas uma pequena porção do músculo pode ser examinada (DUBEY, 2016; VON DOHLEN *et al.*, 2019).

A diferenciação dos cistos de protozoários Apicomplexa (*T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp.) apenas pela microscopia óptica não é confiável e a microscopia eletrônica, imunohistoquímica e técnicas moleculares são necessários para o diagnóstico definitivo. A co-infecção com *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. pode ocorrer e deve entrar no diagnóstico diferencial (DUBEY *et al.*, 1992; DUBEY; SCHARES, 2006). A detecção de cistos dos protozoários na musculatura das aves pode elucidar importantes aspectos na discussão sobre o ciclo de vida dos protozoários.

5.5 CONCLUSÃO

As aves silvestres, arará-canindé e coruja-orelhuda, foram naturalmente infectadas por *T. gondii* e sábia-laranjeira, tucano-de-bico-verde, corujinha-do-mato, coruja-buraqueira, quiriquiri, gavião-de-coleira, gavião-carijó, urubu-preto, marianinha-de-cabeça-amarela, periquito-de-encontro-amarelo, quero-quero, periquitão e garça-branca-grande foram naturalmente infectados por *Sarcocystis* spp. O presente estudo indica que há exposição generalizada a espécies de *Sarcocystis* entre várias ordens de aves silvestres. Mais pesquisas sobre o impacto destes protozoários na saúde das aves silvestres são necessárias.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, I.C.L.; SOARES, R.M.; MAYORGA, L.F.S.P.; ALVES, B.F.; SOARES, H.S.; GENNARI, S.M. Occurrence of tissue cyst forming coccidia in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) rescued on the coast of Brazil. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0209007, 2018.

AL-ADHAMI, B. H.; SIMARD, M.; HERNÁNDEZ-ORTIZ, A.; BOIREAU, C.; GAJADHAR, A. A. Development and evaluation of a modified agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection using tachyzoites cultivated in cell culture. **Food and Waterborne Parasitology**, v.2, p.15-21, 2016.

ALVARADO-ESQUIVEL, C.; PACHECO-VEGA, S. J.; HERNÁNDEZ-TINOCO, J.; SÁNCHEZ-ANGUIANO, L. F.; BERUMEN-SEGOVIA, L. O.; RODRÍGUEZ-ACEVEDO, F. J. I.; GÜERECÁ-GARCÍA, O. A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection and associated risk factors in Huicholes in Mexico. **Parasites & Vectors**, v. 7, n.1, p.1-7, 2014.

ALVES, M. E.; FERNANDES, F. D.; BRÄUNIG, P.; MURER, L.; MINUZZI, C. E.; SANTOS, H. F. D.; SANGIONI, L.A.; VOGEL, F. S. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp. in species of naturally infected birds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 42, 2022.

AMOUEI, A.; SHARIF, M.; HOSSEINI, S. A.; SARVI, S.; MIZANI, A.; SALEHI, S.; DARYANI, A. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic and migrating birds from Mazandaran province, Northern Iran. **Avian Biology Research**, v.11, n.1, p.12-15, 2018.

CABEZÓN, O.; GARCIA-BOCANEGRA, I.; MOLINA-LÓPEZ, R.; MARCO I.; BLANCO, J.M., HOFLE, U.; MARGALIDA, A.; BACH-RAICH, E.; DARWICH, L.; ECHEVERRÍA, I.; OBÓN, E.; HERNÁNDEZ, M.; LAVIN, S.; DUBEY, J.P.; ALMERÍA, S. Seropositivity and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in wild birds from Spain. **PLoS ONE**, v.6, n.12, 2011.

CAMILLO, G.; CADORE, G. C.; FERREIRA, M.S.T.; BRAUNIG, P.; MACIEL, J.F.; PIVOTO, F.L.; SANGIONI, L.A.; VOGEL, F.S.F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in backyard chickens in Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.17, n.2, p.263-265, 2015.

CAMPBELL, K.; PAPANINI, A.; GOMEZ, A.B.; CANNELL, B.; STEPHENS, N. Fatal toxoplasmosis in Little Penguins (*Eudyptula minor*) from Penguin Island, Western Australia. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 17, p. 211-217, 2022.

CERQUEIRA-CÉZAR, C.K.; CALERO-BERNAL, R.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; All about neosporosis in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.26, n.3, p.253-279, 2017.

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

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

DARWICH, L.; CABEZÓN, O.; ECHEVERRIA, I.; PABÓN, M.; MARCO, I.; MOLINA-LOPEZ, R.; ALARCIA-ALEJOSE, O.; LOPEZ-GATIUS, F.; LAVINC, S.; ALMERIA, S. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 183 p.377– 381, 2012.

de BARROS, L.D.; MIURA, A.C.; MINUTTI, A.F.; VIDOTTO O.; GARCIA J.L., *Neospora caninum* in birds: A review. **Parasitology International**, v. 67 p.397–402, 2018.

DEEM, S. L.; MERKEL, J.; BALLWEBER, L.; VARGAS, F. H.; CRUZ, M. B.; PARKER, P. G. Exposure to *Toxoplasma gondii* in Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) and flightless cormorants (*Phalacrocorax harrisi*) in the Galapagos Islands, Ecuador. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, p.1005–1011, 2010.

de WIT, L. A.; CROLL, D. A.; TERSHY, B.; NEWTON, K. M.; SPATZ, D. R.; HOLMES, N. D.; KILPATRICK, A. M. Estimating burdens of neglected tropical zoonotic diseases on islands with introduced mammals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.96, n.3, p.749, 2017.

DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S.A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, p. 216–238, 2015.

DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 121–153, 2002.

DUBEY, J. P.; SPEER C.A.; BOWMAN D.D.; HORTON K.M.; VENTURINI C.; VENTURINI L. Experimental transmission of *Sarcocystis speeri* Dubey and Lindsay, 1999 from the South American opossum (*Didelphis albiventris*) to the North American opossum (*Didelphis virginiana*), **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 624-627, 2000.

DUBEY J.P.; ROSENTHAL B.M.; SPEER C.A., *Sarcocystis lindsayi* n. sp. (Protozoa:Sarcocystidae) from the South American opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil, **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.48 p.595–603, 2001.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p.323-367, 2007.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of animals and humans**, 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2010, p. 1-313.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animal – the last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J.P.; VERMA S.K.; DUNAMS D.; CALERO-BERNAL R.; ROSENTHAL B.M.; Molecular characterization and development of *Sarcocystis speeri* sarcocysts in gamma interferon gene knockout mice. **Parasitology**, v. 142, 1555–1562, 2015.

DUBEY, J.P.; HOWE, D.K.; FURR, M.; SAVILLE, W.J.; MARSH, A.E.; REED, A.M.; GRIGG, M.E. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 209, n.1-2, p.1-42, 2015.

DUBEY, J.P.; CALERO-BERNAL, R.; ROSENTHAL, B.M.; SPEER, C.A.; **Sarcocystosis of animals and humans**, 2 ed. CRC Press, 2016.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of animals and humans** 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 2021, p. 1-353.

GAZZONIS, A.L.; VILLA, L.; LUBIAN, E.; RESSEGOTTI, S.; GRILLI, G., RAIMONDI, S. ZANZANI, S.A.; MANFREDI, M.T. Molecular Survey on *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* Infection in Wild Birds of Prey Admitted to Recovery Centers in Northern Italy **Microorganisms** v.9 736, p,1-10, 2021

GAZZONIS, A.L.; ZANZANI, S.A.; SANTORO, A.; VERONESI, F.; OLIVIERI, E.; VILLA, L.; LUBIAN, E.; LOVATI, S.; BOTTURA, F.; EPIS, S.; MANFREDI, M.T.; *Toxoplasma gondii* infection in raptors from Italy: seroepidemiology and risk factors analysis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 60, p. 42-45, 2018.

GENNARI, S.M.; OGRZEWALSKA, M.; SOARES, H.S.; SARAIVA, D.G.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B.; DUBEY, J.P. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in birds from the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.200, p.193-197, 2014.

GIACCARDI, M.; YORIO, P.; LIZURUME, E. Patronos estacionales de la gaviota cocinera (*L. dominicanus*) em um basural Patagónico y sus relaciones com el manejo de residuos urbanos y pesqueiros. **Ornitologia Neotropical**, v. 8, p. 77-84, 1997.

GJERDE, B; JOSEFSEN, T.D. Molecular characterisation of *Sarcocystis lutrae* n. sp. and *Toxoplasma gondii* from the musculature of two Eurasian otters (*Lutra lutra*) in Norway. **Parasitology Research**, 114 p. 873–886. 2014

GJERDE, B.; VIKØREN, HAMNES, I.S. Molecular identification of *Sarcocystis halietae* n. sp., *Sarcocystis lari* and *Sarcocystis truncata* in the intestine of White-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Norway. **IJP: Parasites and Wildlife**, v.7, p. 1-11, 2018.

GODOY, S.N.; DE PAULA, C.D.; CUBAS, Z.S.; MATUSHIMA, E.R. Occurrence of *Sarcocystis falcatula* in Captive Psittacine Birds in Brazil. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, p. 18–23, 2009.

GODOY, S.N.; CESAR, M.O.; MATUSHIMA, E.R. Sarcosporidiose. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. 2 ed. São Paulo: ROCA, v. 2, 2014, p. 1444-1449.

GONDIM, L.F.P.; MCALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*, **International Journal for Parasitology**, v. 34 p.159–161, 2004.

GONDIM L.F.P.; SOARES R. M.; TAVARESA A. S; BORGES-SILVA W.; DE JESUS R. F.; LLANO, H. A.B., GONDIM L. Q. *Sarcocystis falcatula*-like derived from opossum in Northeastern Brazil: In vitro propagation in avian cells, molecular characterization and bioassay in birds, **International Journal for Parasitology: Parasites and wildlife**. v.10 p.132-137, 2019.

GONDIM, L. F. P.; SOARES, R. M.; MORÉ, G.; JESUS, R. F. D.; & LLANO, H. A. B. *Sarcocystis neurona* and related *Sarcocystis* spp. shed by opossums (*Didelphis* spp.) in South America. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 30, 2021.

GRIFFITHS, R. Sex identification in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v.9, n. 1, p.14–26, 2000.

HALD, T.; ASPINALL, W.; DEVLEESSCHAUWER, B.; COOKE, R.; CORRIGAN, T.; HAVELAAR, A.H.; GIBB, H.J.; TORGERSON, P.R.; KIRK, M.D.; ANGULO, F.J.; et al. World Health Organization Estimates of the Relative Contributions of Food to the Burden of Disease Due to Selected Foodborne Hazards: A Structured Expert Elicitation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0145839, 2016.

KARAKAVUK, M.; ALDEMIR, D.; MERCIER, A.; ATALAY ŞAHAR, E; CAN, H.; MURAT, J.B.; DÖNDÜREN, Ö.; CAN, Ş.; ÖZDEMİR, H.G.; DEĞİRMENCI DÖŞKAYA, A.; PEKTAŞ, B.; DARDÉ, M.L.; GÜRÜZ, A.Y.; DÖŞKAYA, M. Prevalence of toxoplasmosis and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains isolated in wild birds of prey and their relation with previously isolated strains from Turkey. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0196159, 2018.

KUTKIENĖ. L.; PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D.; SRUOGA, A. Description of *Sarcocystis turdusi* sp. nov. from the common blackbird (*Turdus merula*). **Parasitology**, v.139, n.11, p.1438-1443, 2012.

LINDSAY, D.S.; SMITH, P.C.; HOERR, F.J.; BLAGBURN, B.L. Prevalence of encysted *Toxoplasma gondii* in raptors from Alabama. **The Journal of Parasitology**, v. 79, n.6, p. 870-873, 1993.

LLANO, H.A.B.; POLATO, H. Z.; KEID, L.B.; de SOUZA OLIVEIRA, T. M. F.; Zwarg, T.; de OLIVEIRA, A. S., SANCHES, T. C.; JOBERT, A. M.; GONDIM, L.F.P.; SOARES, R. M. Molecular screening for Sarcocystidae in muscles of wild birds from Brazil suggest a plethora of intermediate hosts for *Sarcocystis falcatula* **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**. V. 17, p. 230-238, 2022.

LOSS, S. R.; WILL, T.; MARRA, P. P. The impact of free-ranging domestic cats on wildlife of the United States. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2013.

LÓPEZ UREÑA, L, N.M.; CHAUDHRY, U.; CALERO BERNAL, R.; CANO ALSUA, S.; MESSINA, D.; EVANGELISTA, F.; BETSON, M.; LALLE, M.; JOKELAINEN, P.; ORTEGA MORA, L.M.; ÁLVAREZ GARCÍA, G. Contamination of Soil, Water, Fresh

Produce, and Bivalve Mollusks with *Toxoplasma gondii* Oocysts: A Systematic Review. **Microorganisms**, 10, 517, 2022.

LUKÁŠOVÁ, R.; KOBÉDOVÁ, K.; HALAJIAN, A.; BÁRTOVÁ, E.; MURAT, J.B.; RAMPEDI, K.M.; LUUS-POWELL, W.J. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in birds from South Africa. **Acta Tropica**, v.178, p. 93-96, 2018.

MÁCA, O.; GONZÁLEZ-SOLÍS, D. *Sarcocystis cristata* sp. nov. (Apicomplexa, Sarcocystidae) in the imported great blue turaco *Corythaeola cristata* (Aves, Musophagidae). **Parasites & Vectors**, 14, 2021.

MANSFIELD, L.S.; MEHLER, S.; NELSON, K.; ELSHEIKHA, H.M.; MURPHY, A.J.; KNUST, B.; TANHAUSER, S.M.; GEARHART, P.M.; ROSSANO, M.G.; BOWMAN, D.D.; SCHOTT, H.C. Patterson JS. Brown-headed cowbirds (*Molothrus ater*) harbor *Sarcocystis neurona* and act as intermediate hosts. **Veterinary Parasitology**, v.153, n. 1-2, p. 24-43, 2008.

MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28 p. 1473–1478, 1998.

MINEO, T. W.; CARRASCO, A. O.; RASO, T. F.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2-4, p. 352-355, 2011.

MOLINA-LÓPEZ, R.; CABEZÓN, O.; PABÓN, M.; DARWICH, L.; OBÓN, E.; LOPEZ-GATIUS, F.; ALMERÍA, S. 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.

NARDONI, S.; ROCCHIGIANI, G.; VARVARO, I.; ALTOMONTE, I.; CECCHERELLI, R.; MANCIANTI, F. Serological and Molecular Investigation on *Toxoplasma gondii* Infection in Wild Birds. **Pathogens**, v. 8, n. 2, p. 58, 2019a.

NARDONI, S.; POLI, A.; VARVARO, I.; ROCCHIGIANI, G.; CECCHERELLI, R.; MANCIANTI, F. Detection of *Neospora caninum* DNA in wild birds from Italy. **Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 1–6, 2019b.

PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. **Ekologija**, v. 58, p. 45-58, 2012.

PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D.; ŠVAŽAS, S.; STANEVIČIUS, V. Morphological and genetic characterisation of *Sarcocystis halioti* from the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*). **Parasitology Research**, v.117 p. 3663–3667, 2018.

PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS D.; JUOZAITYTĖ-NGUGU, E. Molecular identification of four *Sarcocystis* species in the herring gull, *Larus argentatus*, from Lithuania, **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2020.

- PRAKAS, P.; BEA, A.; JUOZAITYTĖ-NGUGU, E.; OLANO, I.; VILLANÚA, D.; ŠVAŽAS, S.; BUTKAUSKAS, D. Molecular identification of *Sarcocystis halioti* in the muscles of two species of birds of prey from Spain. **Parasites & Vectors**, v.14, n.414, p. 1-7, 2021.
- PROVENCHER, J. F. Parasites and pollution: Why both matter to marine bird conservation in the North. **Arctic**, 66, p. 516–520.2013.
- PRESTRUD, K. W.; ÅSBAKK, K.; FUGLEI, E.; MØRK, T.; STIEN, A.; ROPSTAD, E., OKSANEN, A. Serosurvey for *Toxoplasma gondii* in arctic foxes and possible sources of infection in the high Arctic of Svalbard. **Veterinary Parasitology**, v.150, p. 6–12, 2007.
- RÊGO, W. M. F. D.; COSTA, J. G. L.; BARAVIERA, R. C. D. A.; PINTO, L. V.; BESSA, G. D. L.; LOPES, R. E. N.; SILVEIRA J.A.G.; VITOR, R. W. Sarcocystidae in wild birds of southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, 2021.
- RIMOLDI, G.; SPEER, B.; WELLEHAN JR, J. F.; BRADWAY, D. S.; WRIGHT, L.; REAVILL, D.; Chin, R. P. An outbreak of *Sarcocystis calchasi* encephalitis in multiple psittacine species within an enclosed zoological aviary. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 6, p.775-781, 2013.
- ROSENTHAL, B. M. Zoonotic sarcocystis. **Research in Veterinary Science**, v.136, p. 151-157, 2021.
- SABINO, U.; MORAIS, R.; DUCA, C. Diet of some passerines in south coast of Espírito Santo state, Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 57, p. 387-391, 2017.
- SHAPIRO, K.; CONRAD, P. A.; MAZET, J. A. K.; WALLENDER, W. W.; MILLER, W. A.; LARGIER, J. L. Effect of estuarine wetland degradation on transport of *Toxoplasma gondii* surrogates from land to sea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p.6821–6828, 2010.
- SHADBOLT, T.; POCKNELL, A.; SAINSBURY, A. W.; EGERTON-READ, S.; BLAKE, D. P. Molecular identification of *Sarcocystis wobeseri*-like parasites in a new intermediate host species, the white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*). **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1845-1850, 2021.
- SILVA, M. A.; PENA, H. F. J.; SOARES, H. S.; AIZAWA, J.; OLIVEIRA, S.; ALVES, B. F.; Souza, D.S.; MELO, R.P.B.; GENNARI, S.M.; MOTA, R.A.; Silva, J.C.R. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from free-ranging and captive birds and mammals in Pernambuco state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, p. 481-487, 2018.
- SOARES, R. M.; LOPES, E. G.; KEID, L. B.; SERCUNDES, M. K.; MARTINS, J.; RICHTZENHAIN, L. J. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the *H. heydorni* RAPD fragment AP10. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 168-172, 2011.

SLAPETA, J. R.; KOUDELA, B.; VOTÝPKA, J.; MODRÝ, D.; HOREJS, R.; LUKES, J. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **The Veterinary Journal**, v.163, n. 2, p.147-154, 2002.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed Guanabara Koogan, 2017.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii* from: animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, 1217-1258, 2000.

LÓPEZ UREÑA, N. M.; CHAUDHRY, U.; CALERO BERNAL, R.; CANO ALSUA, S.; MESSINA, D.; EVANGELISTA, F.; BETSON, M.; LALLE, M.; JOKELAINEN, P.; ORTEGA MORA, L.M.; ÁLVAREZ GARCÍA, G. Contamination of Soil, Water, Fresh Produce, and Bivalve Mollusks with *Toxoplasma gondii* Oocysts: A Systematic Review. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, p. 517, 2022.

VILLAR, D.; KRAMER, M.; HOWARD, L.; HAMMOND, E.; CRAY, C.; LATIMER, K. Clinical Presentation and Pathology of Sarcocystosis in Psittaciform Birds: 11 Cases **Avian Diseases**, v.52(1) p. 187-194, 2008.

VON DOHLEN A. R.; SCOTT, D.; DUBEY J. P.; LINDSAY D. S. Prevalence of *Sarcocysts* in the muscles of raptors from a rehabilitation center in North Carolina, **Journal of Parasitology**, v.105 p. 11-16, 2019.

WIKI AVES - A Enciclopédia das Aves do Brasil. Disponível em: <https://www.wikiaves.com.br/>. Acesso em 25 de setembro de 2021.

WILSON, A. G.; LAPEN, D. R.; MITCHELL, G. W.; PROVENCHER, J. F.; WILSON, S. Interaction of diet and habitat predicts *Toxoplasma gondii* infection rates in wild birds at a global scale. **Global Ecology and Biogeography**, v. 29, n. 7, p.1189-1198, 2020.

WÜNSCHMANN, A., REJMANEK, D., CRUZ-MARTINEZ, L.; BARR B.C.; *Sarcocystis falcatula* associated encephalitis in a free-ranging great horned owl (*Bubo virginianus*), **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 283–287, 2009.

YAN, C., LIANG, L. J., ZHENG, K. Y., & ZHU, X. Q. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*, **Parasites & Vectors**, v.9, n. 137, p.1-7, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a infecção por *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. está presente em várias espécies de aves silvestres ao comprovar a presença de anticorpos no plasma e ou detectar DNA dos protozoários nos tecidos destes animais.

O estudo verificou ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*Sarcocystis* spp. e detectou DNA dos três protozoários em aves carnívoras, onívoras e generalistas tanto de vida livre como em aves mantidas sob os cuidados humanos. Estes achados são importantes pois demonstram a exposição a estes protozoários por meio do hábito alimentar e sugerem contaminação do ambiente por oocistos e ou esporocistos. As aves pertencem a todos os níveis tróficos e podem se infectar pela ingestão de alimentos e água contaminados com esporocistos e oocistos esporulados, e por meio da ingestão de cistos em tecidos infectados. Por isso, o hábito alimentar das aves deve ser levado em conta para entender a sua participação no ciclo biológico desses parasitos.

Este estudo também detectou *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. em aves marinhas. Estes achados são muito importantes e relevantes porque a identificação destes protozoários nesta população de aves é um indicativo de que os parasitos podem estar no ambiente marinho. Nos últimos anos *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. têm se mostrado uma ameaça para algumas espécies de mamíferos marinhos, como lontras marinhas, golfinhos e baleias. A poluição antropogênica da linha costeira com esgoto ou escoamento superficial de água doce contaminada com oocistos de *T. gondii* é provavelmente o fator chave na epidemiologia da toxoplasmose no ambiente marinho.

O estudo demonstrou que o gaivotão foi a espécie da ave marinha mais afetada indicando ampla exposição aos protozoários. Estes achados são importantes porque o gaivotão é a ave marinha mais abundante no litoral sul do Brasil e é considerada uma das espécies mais oportunistas e generalistas entre as aves marinhas. Compreender a disseminação de *T. gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. em aves com esse tipo de comportamento alimentar (oportunista e generalista) é de interesse para entender o envolvimento epidemiológico dessas aves na manutenção e disseminação desses protozoários.

O presente estudo amplia a gama de espécies de aves em que o DNA de protozoários da família Sarcocystidae foi detectado e indica que há exposição generalizada às espécies de *Sarcocystis* principalmente a *S. falcatula*. A identificação de sarcocistos na musculatura peitoral dessas aves, além de interessante, contribui para elucidar importantes aspectos na discussão sobre o ciclo de vida desses protozoários.

O desenvolvimento deste estudo foi um importante avanço no conhecimento acerca destes protozoários na população de aves silvestres de várias ordens taxonômicas. A carência de dados publicados sobre doenças infecciosas e parasitárias das espécies silvestres no país revela que, apesar do país ser detentor de uma das maiores biodiversidades do mundo, ainda tem muito a avançar nas pesquisas e estudos para entender a própria fauna.

Estudos adicionais sobre o impacto desses protozoários no ambiente e na saúde das aves silvestres são necessários e encorajados para ampliar o conhecimento nas áreas de diagnóstico, prevenção, aspectos epidemiológicos e de conservação de fauna.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, I.C.L.; SOARES R.M.; MAYORGA, L.F.S.P.; ALVES, B.F.; SOARES, H.S.; GENNARI, S.M. Occurrence of tissue cyst forming coccidia in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) rescued on the coast of Brazil. **PLoS ONE** v.13, n. 2, p. e0209007, 2018.
- ACOSTA, I.C.L.; SOUZA-FILHO, A.F.; MUÑOZ-LEAL, S.; SOARES, H.S.; HEINEMANN, M.B.; MORENO, L.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; GENNARI, S.M. Evaluation of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) on Magdalena Island, Chile. **Veterinary Parasitology Regional Studies and Reports**, v.16, p. 100282, 2019.
- ACOSTA, I. C.L.; GENNARI, S. M.; LLANO, H. A.; MUÑOZ-LEAL, S.; SOARES, R.M. Molecular characterization of new haplotype of genus *Sarcocystis* in seabirds from Magdalena Island, southern Chile. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 245, 2021.
- AL-ADHAMI, B. H.; SIMARD, M.; HERNÁNDEZ-ORTIZ, A.; BOIREAU, C. & GAJADHAR, A. A. Development and evaluation of a modified agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection using tachyzoites cultivated in cell culture. **Food and Waterborne Parasitology**, v.2, p.15-21, 2016.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; PACHECO-VEGA, S. J.; HERNÁNDEZ-TINOCO, J.; SÁNCHEZ-ANGUIANO, L. F.; BERUMEN-SEGOVIA, L. O.; RODRÍGUEZ-ACEVEDO, F. J. I.; GÜERECÁ-GARCÍA, O. A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection and associated risk factors in Huicholes in Mexico. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p.1-7, 2014.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVES, M. E.; FERNANDES, F. D.; BRÄUNIG, P.; MURER, L.; MINUZZI, C. E.; SANTOS, H. F. D.; SANGIONI, L.A.; VOGEL, F. S. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp. in species of naturally infected birds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 42, 2022.
- AMOUEI, A.; SHARIF, M.; HOSSEINI, S. A.; SARVI, S.; MIZANI, A.; SALEHI, S.; DARYANI, A. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic and migrating birds from Mazandaran province, Northern Iran. **Avian Biology Research**, v.11, n.1, p.12-15, 2018.
- ANDRADE, L.H.M.; LUGARINI, C.; OLIVEIRA, R.A.S.; SILVA, L.T.R.; MARVULLO, M.F.V.; GARCIA, J.E.; DUBEY, J.P.; SILVA, J.C.R. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em aves silvestres de três unidades de conservação federais da Paraíba e da Bahia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p.103-107, 2016.
- BALLANCE, L.T. Understanding seabirds at sea: Why and how? **Marine Ornithology**, v. 35, p. 127-135, 2007.

BALADRÓN, A.V.; BÓ, M.S.; MALIZIA, A.I.; BECHARD, M.J. Food habits of the Roadside Hawk (*Buteo magnirostris*) during the nonbreeding season in the Southeastern Pampas of Argentina. **Journal Raptor Research**, v.45 p. 257-261, 2011.

BAMAC, O. E.; ROGERS, K. H.; ARRANZ-SOLÍS, D.; SAEIJ, J.P.J.; LEWIS, S.; DUERR, R.; SKOGLUND, J.; PERONNE, L.; METE A. Protozoal encephalitis associated with *Sarcocystis calchasi* and *S. falcatula* during an epizootic involving Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in coastal Southern California, USA. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 12, p. 185-191, 2020.

BARBIERI, E. Diversity of the diet and the behavior of *Larus dominicanus* in the Keller Peninsula, King George Island, South Shetland. **O Mundo da Saúde**, v. 32(3), p. 302-307, 2008.

BARBOSA, A.D.; MARTINS, N.R.S.; MAGALHAES, 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.

BRANCO, J.O. Aves marinhas das Ilhas de Santa Catarina. In: **Aves marinhas e insulares brasileiras: bioecologia e conservação**. Editora da UNIVALI, Itajai, pp.15-36, 2004.

CABEZÓN, O.; GARCIA-BOCANEGRA, I.; MOLINA-LÓPEZ, R.; MARCO I.; BLANCO, J.M.; HOFLE, U.; MARGALIDA, A.; BACH-RAICH, E.; DARWICH, L.; ECHEVERRÍA, I.; OBÓN, E.; HERNÁNDEZ, M.; LAVIN, S.; DUBEY, J.P.; ALMERÍA, S. Seropositivity and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in wild birds from Spain, **PLoS ONE**, v.6, n.12, 2011.

CABEZÓN, O.; CERDÀ-CUÉLLAR, M.; MORERA, V; GARCÍA-BOCANEGRA, I; GONZÁLEZ-SOLÍS J.; NAPP, S.; RIBAS, M. P.; BLANCH-LÁZARO, B.; FERNÁNDEZ-AGUILAR, X; ANTILLES, N.; LÓPEZ-SORIA S.; LORCA-ORÓ, C.; DUBEY, J. P.; ALMERÍA S. *Toxoplasma gondii* infection in seagull chicks is related to the consumption of freshwater food resources. **PLoS ONE**, v. 11 n. 3, p. 1–11, 2016.

CAMILLO, G.; CADORE, G. C.; FERREIRA, M.S.T.; BRAUNIG, P.; MACIEL, J.F.; PIVOTO, F.L.; SANGIONI, L.A.; VOGEL, F.S.F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in backyard chickens in Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.17, n.2, p.263-265, 2015.

CAMPBELL, K.; PAPARINI, A.; GOMEZ, A.B.; CANNELL, B.; STEPHENS, N. Fatal toxoplasmosis in Little Penguins (*Eudyptula minor*) from Penguin Island, Western Australia. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 17, p. 211-217, 2022.

CASARTELLI-ALVES, L.; BOECHAT, V.C.; MACEDO-COUTO, R.; FERREIRA, L.C.; NICOLAU, J.L.; NEVES, L.B.; MILLAR, P.R.; VICENTE, R.T.; OLIVEIRA, R.V.; MUNIZ, A.G.; BONNA, I.C.; AMENDOEIRA, M.R.; SILVA, R.C.; LANGONI, H.;

SCHUBACH, T.M.; MENEZES, R.C. Sensitivity and specificity of serological tests, histopathology and immunohistochemistry for detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic chickens. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 346-351, 2014.

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

CERQUEIRA-CÉZAR, C.K.; CALERO-BERNAL, R.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; All about neosporosis in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.26, n. 3, p.253-279, 2017.

CLARK, C. J.; POULSEN, J. R.; CONNOR, E. F.; PARKER, V.T. Fruiting trees as dispersal foci in a semi-deciduous tropical forest. **Ecology**, v.139 p. 66-75, 2004.

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

CONRAD, P.A.; MILLER, M.A.; KREUDER, C.; JAMES, E.R.; MAZET, J. DABRITZ, H.; JESSUP, D.A.; GULLAND, F.; GRIGG, M. E. Transmission of *Toxoplasma*: Clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1155-1168, 2005.

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

CRAY, C.; VILLAR, D. Cross-reactivity of anti-chicken IgY antibody with immunoglobulins of exotic avian species. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 37, n. 3, p. 328-331, 2008.

DARWICH, L.; CABEZÓN, O.; ECHEVERRIA, I.; PABÓN, M.; MARCO, I.; MOLINA-LOPEZ, R.; ALARCIA-ALEJOSE, O.; LOPEZ-GATIUS, F.; LAVINC, S.; ALMERIA, S. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 183 p.377– 381, 2012.

DEEM, S. L.; MERKEL, J.; BALLWEBER, L.; VARGAS, F. H.; CRUZ, M. B.; PARKER, P. G. Exposure to *Toxoplasma gondii* in Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) and flightless cormorants (*Phalacrocorax harrisi*) in the Galapagos Islands, Ecuador. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, p.1005–1011, 2010.

de BARROS, L.D.; MIURA, A.C.; MINUTTI, A.F.; VIDOTTO O.; GARCIA J.L., *Neospora caninum* in birds: A review. **Parasitology International**, v. 67 p.397–402, 2018.

de JESUS, R.F.; BORGES-SILVA, W.; BEZERRA, T.L.; GONDIM, L.Q.; UZÊDA, R.S.; GONDIM, L.F.P. Serologic cross-reactivity between *Sarcocystis neurona* and

Sarcocystis falcatula-like in experimentally infected Mongolian gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 276, p. 108962, 2019.

de MATOS, A. M. R. N.; DOMIT, C.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Seabirds: Studies with parasitofauna and potential indicator for environmental anthropogenic impacts. **Semina Ciências Agrárias**, v.41, n. 4, p.1439–1450, 2020.

de WIT, L. A.; CROLL, D. A.; TERSHY, B.; NEWTON, K. M.; SPATZ, D. R.; HOLMES, N. D. & KILPATRICK, A. M. Estimating burdens of neglected tropical zoonotic diseases on islands with introduced mammals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 3, p.749, 2017.

DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D. & ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, p. 216–238, 2015.

DROUIN, T. E.; MAHRT, J. L. The prevalence of *Sarcocystis* Lankester, 1882, in some bird species in western Canada, with notes on its life cycle. **Canadian Journal of Zoology**, v. 57, n. 10, p. 1915-1921, 1979.

DUBEY, J.P. A review of *Neospora caninum* and *Neospora*-like infections in animals. **Journal of Protozoology Research**, v. 2, p. 40-52,1992.

DUBEY, J.P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. **Journal of Parasitology**, v.81, p.410–415, 1995.

DUBEY, J. P.; SPEER C.A.; BOWMAN D.D.; HORTON K.M.; VENTURINI C.; VENTURINI L. Experimental transmission of *Sarcocystis speeri* Dubey and Lindsay, 1999 from the South American opossum (*Didelphis albiventris*) to the North American opossum (*Didelphis virginiana*). **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 624-627, 2000.

DUBEY J.P.; ROSENTHAL B.M.; SPEER C.A., *Sarcocystis lindsayi* n. sp. (Protozoa:Sarcocystidae) from the South American opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.48 p.595–603, 2001.

DUBEY, J.P.; GARNER; M.M.; STETTER, M.D.; MARSH, A.E.; BARR, B.C. Acute *Sarcocystis falcatula*-like infection in a carmine bee-eater (*Merops nubicus*) and immunohistochemical cross reactivity between *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona*. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 824–832, 2001.

DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 121–153, 2002.

DUBEY, J. P.; ZARNKE, R.; THOMAS, N. J.; WONG, S. K.; VAN BONN, W.; BRIGGS, M.; DAVIS, J. W.; EWING, R.; MENSE, M.; KWOK, O. C. H.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. *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.; ROSENTHAL B.; MORALES, J.; ALFARO, A. Morphologic and genetic characterization of *Sarcocystis* sp. from the African grey parrot, *Psittacus erithacus*, from Costa Rica. **Acta Parasitologica**, v. 51, n. 3, p. 161-168, 2006.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p.323-367, 2007.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of animals and humans** CRC Press 2 ed, p. 1-313, 2010.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animal – the last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, p. 90-108, 2011.

DUBEY, J.P.; VERMA S.K.; DUNAMS D.; CALERO-BERNAL R.; ROSENTHAL B.M.; Molecular characterization and development of *Sarcocystis speeri* sarcocysts in gamma interferon gene knockout mice. **Parasitology**, v. 142, 1555–1562, 2015.

DUBEY, J.P.; HOWE, D.K.; FURR, M.; SAVILLE, W.J.; MARSH, A.E.; REED, A.M.; GRIGG, M.E. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 209, n.1-2, p.1-42, 2015.

DUBEY, J.P.; CALERO-BERNAL, R.; ROSENTHAL, B.M.; SPEER, C.A.; **Sarcocystosis of animals and humans**, CRC Press, 2 ed. 2016.

DUBEY, J.P.; MURATA, F.H.A.; CERQUEIRA-CÉZAR, C.K.; KWOK, O.C.H.; GRIGG, M.E. Recent epidemiologic and clinical importance of *Toxoplasma gondii* infections in marine mammals: 2009-2020. **Veterinary Parasitology**, v. 288, p. 109296, 2020.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of animals and humans** 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 2021.

EL-MORSEY, A.; EL-SEIFY, M.; DESOUKY, A. Y.; ABDEL-AZIZ, M. M.; SAKAI, H.; YANAI, T. *Sarcocystis chloropusae* (protozoa: Sarcocystidae) n. sp. from the common moorhen (*Gallinula chloropus*) from Egypt. **Parasitology**, v. 142, n. 8, p. 1063-1065, 2015.

FIALHO, C. G.; TEIXEIRA, M. C.; ARAÚJO, F. A. P. Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, p.1-23, 2009.

FUJII, K.; KAKUMOTO, C.; KOBAYASHI, M.; SAITO, S.; KARIYA, T.; WATANABE, Y.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; SUZUKI, M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in seals around Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 4, p. 393-398, 2007.

FURNESS, R. W.; CAMPHUYSEN, K. Seabirds as monitors of the marine environment. **IceS Journal of Marine Science**, v. 54, n. 4, p. 726-737, 1997.

GAZZONIS, A.L.; ZANZANI, S.A.; SANTORO, A.; VERONESI, F.; OLIVIERI, E.; VILLA, L.; LUBIAN, E.; LOVATI, S.; BOTTURA, F.; EPIS, S.; MANFREDI, M.T.; *Toxoplasma gondii* infection in raptors from Italy: seroepidemiology and risk factors analysis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 60, p. 42-45, 2018.

GAZZONIS, A.L.; VILLA, L.; LUBIAN, E.; RESSEGOTTI, S.; GRILLI, G., RAIMONDI, S. ZANZANI, S.A.; MANFREDI, M.T. Molecular Survey on *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* Infection in Wild Birds of Prey Admitted to Recovery Centers in Northern Italy. **Microorganisms**, v.9 736, p,1-10, 2021.

GENNARI, S.M.; OGRZEWALSKA, M.; SOARES, H.S.; SARAIVA, D.G.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B.; DUBEY, J.P. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in birds from the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.200, p.193-197, 2014.

GENNARI, S. M.; NIEMEYER, C.; SOARES, H. S.; MUSSO, C. M.; SIQUEIRA, G. C. C.; CATÃO-DIAS, J. L.; DIAS, R. A.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in seabirds from Abrolhos. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 50-52, 2016.

GIACCARDI, M.; YORIO, P.; LIZURUME, E. Patrones estacionales de la gaviota cocinera (*L. dominicanus*) em um basural Patagónico y sus relaciones com el manejo de resíduos urbanos y pesqueiros. **Ornitologia Neotropical**, v. 8, p. 77-84, 1997.

GJERDE, B; JOSEFSEN, T.D. Molecular characterisation of *Sarcocystis lutrae* n. sp. and *Toxoplasma gondii* from the musculature of two Eurasian otters (*Lutra lutra*) in Norway. **Parasitology Research**, 114 p. 873–886. 2014.

GJERDE, B.; VIKØREN, T.; HAMNES, I.S. Molecular identification of *Sarcocystis halioti* n. sp., *Sarcocystis lari* and *Sarcocystis truncata* in the intestine of White-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Norway. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.7, p. 1-11, 2018.

GODOY, S.N.; DE PAULA, C.D.; CUBAS, Z.S.; MATUSHIMA, E.R. Occurrence of *Sarcocystis falcatula* in Captive Psittacine Birds in Brazil. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, p. 18–23, 2009.

GODOY, S.N.; CESAR, M.O.; MATUSHIMA, E.R. Sarcosporidiose. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. 2 ed, São Paulo: ROCA, vol. 2, p. 1444-1449, 2014.

GONDIM, L.F.P.; MCALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34 p.159–161, 2004.

GONDIM, L.S.; ABE-SANDES, K.; UZÊDA, R.S.; SILVA, M.S.; SANTOS, S.L.; MOTA, R.A.; VILELA, S.M.; GONDIM, L.F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 168, p. 1-2, 2010.

GONDIM, L.F.P.; MINEO, J.R.; SCHARES, G. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp. and *Besnoitia besnoiti*. **Parasitology**, v. 144, n. 7, p. 851-868, 2017.

GONDIM L.F.P.; SOARES R. M.; TAVARESA A. S; BORGES-SILVA W.; DE JESUS R. F.; LLANO, H. A.B., GONDIM L. Q. *Sarcocystis falcatula*-like derived from opossum in Northeastern Brazil: In vitro propagation in avian cells, molecular characterization and bioassay in birds. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.10 p.132-137, 2019.

GONDIM, L. F. P.; SOARES, R. M.; MORÉ, G.; JESUS, R. F. D.; LLANO, H. A. B. *Sarcocystis neurona* and related *Sarcocystis* spp. shed by opossums (*Didelphis* spp.) in South America. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 30, 2021.

GRIFFITHS, R. Sex identification in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v.9, n. 1, p.14–26, 2000.

HALD, T.; ASPINALL, W.; DEVLEESSCHAUWER, B.; COOKE, R.; CORRIGAN, T.; HAVELAAR, A.H.; GIBB, H.J.; TORGERSON, P.R.; KIRK, M.D.; ANGULO, F.J.; et al. World Health Organization Estimates of the Relative Contributions of Food to the Burden of Disease Due to Selected Foodborne Hazards: A Structured Expert Elicitation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0145839, 2016.

HYRENBACH, K.D. Plumage-based ageing criteria for the black-footed albatross *Phoebastria nigripes*. **Marine Ornithology**, v. 30, p. 85-93, 2002.

JONES, J.L.; DUBEY, J.P., Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. **Experimental Parasitology**, v.124, p. 10-25, 2010.

JUOZAITYTĖ-NGUGU, E., ŠVAŽAS, S.; ŠNEIDERIS, D.; RUDAITYTĖ-LUKOŠIENĖ, E.; BUTKAUSKAS, D.; PRAKAS, P. The Role of Birds of the Family Corvidae in Transmitting *Sarcocystis* Protozoan Parasites. **Animals** v. 11, n. 11, p. 3258, 2021.

KARAKAVUK, M.; ALDEMIR, D.; MERCIER, A.; ATALAY ŞAHAR, E; CAN, H.; MURAT, J.B.; DÖNDÜREN, Ö.; CAN, Ş.; ÖZDEMİR, H.G.; DEĞİRMENCI DÖŞKAYA, A.; PEKTAŞ, B.; DARDÉ, M.L.; GÜRÜZ, A.Y.; DÖŞKAYA, M. Prevalence of toxoplasmosis and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains isolated in wild birds of prey and their relation with previously isolated strains from Turkey. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0196159, 2018.

KING, J.S., ŠLAPETA, J., JENKINS, D.J., AL-QASSAB, S.E., ELLIS, J.T., WINDSOR, P.A., Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 945–950, 2010.

KIREJCZYK, S.G.M.; BURNS, R.E.; HYATT, M.W.; YABSLEY, M.J.; TER BEEST, J.M.; GYIMESI, Z.S.; OSSIBOFF, R.J.; WALTMAN, A.; SEIMON, T.A.; MCMANAMON, R. Fatal *Sarcocystis falcatula* infection in three penguins. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 340, 2019.

KONELL, A. L., SATO, A.P., MALAGUINI, N.P. dos ANJOS A, FERREIRA, R.F., LOCATELLI-DITTRICH R. Serosurvey of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* in geese (*Anser* sp.) from urban parks and captivity. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28(2) p. 221-228, 2019.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

KUTKIENĖ. L.; PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D.; SRUOGA, A. Description of *Sarcocystis turdusi* sp. nov. from the common blackbird (*Turdus merula*). **Parasitology**, v.139, n.11, p.1438-1443, 2012.

LINDSAY, D.S.; SMITH, P.C.; HOERR, F.J.; BLAGBURN, B.L. Prevalence of encysted *Toxoplasma gondii* in raptors from Alabama. **The Journal of Parasitology**, v. 79, n.6, p. 870-873, 1993.

LINDSAY, D.S.; COLLINS, M.V.; MITCHELL, S.M.; WETECH, C.N.; ROSYPAL, A.C.; FLICK, G.J.; ZAJAC, A.M.; LINDQUIST, A.; DUBEY, J.P. Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Parasitology**, v.90, p.1054–1057, 2004.

LLANO, H.A.B.; POLATO, H. Z.; KEID, L.B.; de SOUZA OLIVEIRA, T. M. F.; Zwarg, T.; de OLIVEIRA, A. S., SANCHES, T. C.; JOPPERT, A. M.; GONDIM, L.F.P.; SOARES, R. M. Molecular screening for Sarcocystidae in muscles of wild birds from Brazil suggest a plethora of intermediate hosts for *Sarcocystis falcatula*. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 17, p. 230-238, 2022.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; DITTRICH, J.R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO JOINEAU, M.E.; ANTUNES, J.; PINCKNEY, R.D.; DECONTO, I.; HOFFMANN, D.C.S.; THOMAZ SOCCOL, V. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.135, p. 215–221, 2006.

LÓPEZ UREÑA, L, N.M.; CHAUDHRY, U.; CALERO BERNAL, R.; CANO ALSUA, S.; MESSINA, D.; EVANGELISTA, F.; BETSON, M.; LALLE, M.; JOKELAINEN, P.; ORTEGA MORA, L.M.; ÁLVAREZ GARCÍA, G. Contamination of Soil, Water, Fresh Produce, and Bivalve Mollusks with *Toxoplasma gondii* Oocysts: A Systematic Review. **Microorganisms**, 10, 517, 2022.

LOSS, S. R.; WILL, T.; MARRA, P. P. The impact of free-ranging domestic cats on wildlife of the United States. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2013.

LUKÁŠOVÁ, R.; KOBÉDOVÁ, K.; HALAJIAN, A.; BÁRTOVÁ, E.; MURAT, J.B.; RAMPEDI, K.M.; LUUS-POWELL, W.J. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in birds from South Africa. **Acta Tropica**, v.178, p. 93-96, 2018.

MÁCA, O.; GONZÁLEZ-SOLÍS, D. *Sarcocystis cristata* sp. nov. (Apicomplexa, Sarcocystidae) in the imported great blue turaco *Corythaeola cristata* (Aves, Musophagidae). **Parasites & Vectors**, v.14, p.1-7, 2021.

MÁCA, O.; GONZÁLEZ-SÓLIS, D. Role of three bird species in the life cycle of two *Sarcocystis* spp. (Apicomplexa, Sarcocystidae) in the Czech Republic. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 17, p. 133-137, 2022.

MAIER-SAM, K.; KAIPONEN, T.; SCHMITZ, A.; SCHULZE, C.; BOCK, S.; HLINAK, A.; OLIAS, P. Encephalitis associated with *Sarcocystis halioti* infection in a free-ranging little owl (*Athene noctua*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 57, n. 3, p. 712-714, 2021.

MAIER, K.; OLIAS, P.; ENDERLEIN, D.; KLOPFLEISCH, R.; MAYR, S. L.; GRUBER, A. D.; LIERZ, M. Parasite distribution and early-stage encephalitis in *Sarcocystis calchasi* infections in domestic pigeons (*Columba livia* f. *domestica*). **Avian Pathology**, v. 44, n. 1, p. 5-12, 2015.

MALLORY, M. L.; ROBINSON, S. A.; HEBERT, C. E.; FORBES, M. R. Seabirds as indicators of aquatic ecosystem conditions: A case for gathering multiple proxies of seabird health. **Marine Pollution Bulletin**, v.60, p. 7-12, 2010.

MANSFIELD, L.S.; MEHLER, S.; NELSON, K.; ELSHEIKHA, H.M.; MURPHY, A.J.; KNUST, B.; TANHAUSER, S.M.; GEARHART, P.M.; ROSSANO, M.G.; BOWMAN, D.D.; SCHOTT, H.C. Patterson JS. Brown-headed cowbirds (*Molothrus ater*) harbor *Sarcocystis neurona* and act as intermediate hosts. **Veterinary Parasitology**, v.153, n. 1-2, p. 24-43, 2008.

MAYR, S.L.; MAIER, K.; MÜLLER, J.; ENDERLEIN, D.; GRUBER, A.D.; LIERZ, M. *Accipiter* hawks (Accipitridae) confirmed as definitive hosts of *Sarcocystis turdusi*, *Sarcocystis cornixi* and *Sarcocystis* sp. ex *Phalacrocorax carbo*. **Parasitology Research**, v.115, p. 3041–3047, 2016.

MCALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28 p. 1473–1478, 1998.

MARIETTO-GONÇALVES, G.A.; ALMEIDA, S.M.; CAMOSSI, L.G.; LANGONI, H.; FILHO, R.L.A. Avaliação sorológica de Parainfluenzavirus Tipo 1, *Salmonella* spp., *Mycoplasma* spp. e *Toxoplasma gondii* em aves silvestres. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, p.473-480, 2013.

MARINO, A.M.F.; GIUNTA, R.P.; SALVAGGIO, A.; CASTELLO, A.; ALFONZETTI, T.; BARBAGALLO, A.; APARO, A.; SCALZO, F.; REALE, S.; BUFFOLANO, W.; PERCIPALLE, M. *Toxoplasma gondii* in edible fishes captured in the Mediterranean basin. **Zoonoses Public Health**, v. 66, p. 826–834, 2019.

MASSIE, G.N.; WARE, M.W.; VILLEGAS, E.N.; BLACK, M.W. Uptake and transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by migratory filter-feeding fish. **Veterinary Parasitology**, v.169, 296–303, 2010.

- MIAO, Q.; HAN, J. Q.; XIANG, X.; YUAN, F. Z.; LIU, Y. Z.; DUAN, G.; ZHU, X. Q.; ZOU, F. C. Prevalence of antibody to *Toxoplasma gondii* in black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*), Dianchi lake, China. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 50, n. 3, p. 717-719, 2014.
- MILLER, M. A.; SVERLOW, K.; CROSBIE, P. R.; BARR, B. C.; LOWENSTINE, L. J.; GULLAND, F. M.; PACKHAM, A.; CONRAD, P.A. Isolation and characterization of two parasitic protozoa from a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*) with meningoencephalomyelitis. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 816-822, 2001.
- MILNE, I.; WRIGHT, F.; ROWE, G.; MARSHALL, D.; HUSMEIER, D.; MCGUIRE, G. TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. **Bioinformatics**, v. 20, p.1806–1807, 2004.
- MINEO, T. W.; CARRASCO, A. O.; RASO, T. F.; WERTHER, K.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z. Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2-4, p. 352-355, 2011.
- MOLINA-LÓPEZ, R.; CABEZÓN, O.; PABÓN, M.; DARWICH, L.; OBÓN, E.; LOPEZ-GATIUS, F.; DUBEY, J.P.; ALMERÍA, S. 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.
- MOREL, A.P.; WEBSTER, A.; RECK, J., Serosurvey of *Toxoplasma gondii* (eucoccidiorida: sarcocystidae) in southern caracaras (*Caracara plancus*), Rio Grande do Sul, Brazil, **Journal of Raptor Research**, v. 54 p. 81–83, 2020.
- MUNDAY, B. L.; HARTLEY, W. J.; HARRIGAN, K. E.; PRESIDENTE, P. J. A.; OBENDORF, D. L. *Sarcocystis* and related organisms in Australian wildlife: II. Survey findings in birds, reptiles, amphibians and fish. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 15, n. 1, p. 57-73, 1979.
- NARDONI, S.; POLI, A.; VARVARO, I.; ROCCHIGIANI, G.; CECCHERELLI, R.; MANCIANTI, F. Detection of *Neospora caninum* DNA in wild birds from Italy. **Pathogens**, v.8, n. 4, 1–6, 2019a.
- NARDONI, S.; ROCCHIGIANI, G.; VARVARO, I.; ALTOMONTE, I.; CECCHERELLI, R.; MANCIANTI, F. Serological and Molecular Investigation on *Toxoplasma gondii* Infection in Wild Birds. **Pathogens**, v. 8, n. 2, p. 58, 2019b.
- OLIAS, P.; OLIAS, L.; LIERZ, M.; MEHLHORN, H.; GRUBER, A.D. *Sarcocystis calchasi* is distinct to *Sarcocystis columbae* sp. nov. from the wood pigeon (*Columba palumbus*) and *Sarcocystis* sp. from the sparrowhawk (*Accipiter nisus*). **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 1-2, p. 7-14, 2010.
- OLIAS, P.; GRUBER, A.D.; HAFEZ, H.M.; HEYDORN A.O.; MEHLHORN, H.; LIERZ, M. *Sarcocystis calchasi* sp. nov. of the domestic pigeon (*Columba livia f. domestica*) and the Northern goshawk (*Accipiter gentilis*): light and electron microscopical characteristics. **Parasitology Research**, v. 106, n. 3, p. 577-585, 2010.

OLIAS, P.; MAIER, K.; WUENSCHMANN, A.; REED, L.; ARMIÉN, A.G.; SHAW D.P.; GRUBER A.D.; LIERZ, M. *Sarcocystis calchasi* has an expanded host range and induces neurological disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) and North American rock pigeons (*Columba livia f. dom.*). **Veterinary Parasitology**, v. 200, p. 59–65, 2014.

OTRANTO, D.; LAZARI, A.; TESTINI, G.; TRAVERSA, D.; REGALBONO, A.F.; BADAN, M.; CAPELLI, G. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.118, p.7-18, 2003.

PACHECO, J.F.; SILVEIRA, L.F.; ALEIXO, A.; AGNE, C.E.; BENCKE, G.A.; BRAVO, G.A.; BRITO, G.R.R.; COHN-HAFT, M.; MAURÍCIO, G.N.; NAKA, L.N.; OLMOS, F.; POSSO, S.; LEES, A.C.; FIGUEIREDO, L.F.A.; CARRANO, E.; GUEDES, R.C.; CESARI, E.; FRANZ, I.; SCHUNCK, F. & PIACENTINI, V.Q. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee – second edition. **Ornithology Research**, v. 29(2), p.1-123, 2021.

PAK, S.M.; ESHTOKINA, N.V. Sarcosporidians of birds, in: **Panin, V.J.**, (Ed.), Sarcosporidians of animals in Kazakhstan. Nauka, Almaty, p.150–168, 1984.

PANASCI T.; WHITACRE D. Diet and foraging behavior of nesting Roadside Hawks in Petén, Guatemala. **Wilson Bulletin**, v. 112 p.555-558, 2000.

PETRY, M. V.; SCHERER, J.F.M.; SCHERER, A. L. Ocorrência, alimentação e impactos antrópicos de aves marinhas nas praias do litoral do Rio Grande do Sul, sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 20, n. 1, p. 65-70, 2012.

PIACENTINI, V. Q.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; MAURÍCIO, G. N.; PACHECO, J. F.; BRAVO, G. A.; BRITO, G. R. R.; NAKA, L. N.; OLMOS, F.; POSSO, S.; SILVEIRA, L. F.; BETINI, G. S.; CARRANO, E.; FRANZ, I.; LEES, A. C.; LIMA, L. M.; PIOLI, D.; SCHUNCK, F.; AMARAL, F. R.; BENCKE, G. A.; COHN-HAFT, M.; FIGUEIREDO, L. F. A.; STRAUBE F. C. & CESARI, E. 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. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.23(2) p.91–298, 2015.

PINAYEVA, L.M., PAK, C.M.; KOKHNO, L.I. *Sarcocystis* of the wild birds of Kazakhstan. **Parasitology International**, n. 47, p. 143, 1998.

PRAKAS, P., KUTKIENĖ, L.; SRUOGA, A.; BUTKAUSKAS, D. *Sarcocystis* sp. from the herring gull (*Larus argentatus*) identity to *Sarcocystis wobeseri* based on cyst morphology and DNA results. **Parasitology Research**, v.109, p.1603–1608, 2011.

PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. **Ekologija**, v. 58, p. 45-58, 2012.

PRAKAS, P.; KUTKIENĖ, L.; BUTKAUSKAS, D.; SRUOGA, A.; ŽALAKEVIČIUS, M. Molecular and morphological investigations of *Sarcocystis corvusi* sp. nov from the jackdaw (*Corvus monedula*). **Parasitology Research** v.112 p.1163–1167. 2013.

PRAKAS, P.; KUTKIENĖ, L.; BUTKAUSKAS, D.; SRUOGA, A.; ŽALAKEVIČIUS, M. Description of *Sarcocystis lari* sp. n. (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the great black-backed gull, *Larus marinus* (Charadriiformes: Laridae), on the basis of cyst morphology and molecular data. **Folia Parasitologica**, v. 61, n. 1, p. 11, 2014.

PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D.; ŠVAŽAS, S.; STANEVIČIUS, V. Morphological and genetic characterisation of *Sarcocystis halietae* from the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*). **Parasitology Research**, v.117 p. 3663–3667, 2018.

PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D.; ŠVAŽAS, S.; JUOZAITYTĖ-NGUGU, E.; STANEVIČIUS, V. Morphologic and genetic identification of *Sarcocystis fulicae* n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the Eurasian coot (*Fulica atra*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 54, n. 4, p. 765-771, 2018.

PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D.; JUOZAITYTĖ-NGUGU, E. Molecular identification of four *Sarcocystis* species in the herring gull, *Larus argentatus*, from Lithuania. **Parasites & Vectors**, v. 613(1), p. 1-6, 2020.

PRAKAS, P.; BEA, A.; JUOZAITYTĖ-NGUGU, E.; OLANO, I.; VILLANÚA, D.; ŠVAŽAS, S.; BUTKAUSKAS, D. Molecular identification of *Sarcocystis halietae* in the muscles of two species of birds of prey from Spain. **Parasites & Vectors**, v.14, n.414, p. 1-7, 2021.

PRESTRUD, K. W.; ÅSBAKK, K.; FUGLEI, E.; MØRK, T.; STIEN, A.; ROPSTAD, E., OKSANEN, A. Serosurvey for *Toxoplasma gondii* in arctic foxes and possible sources of infection in the high Arctic of Svalbard. **Veterinary Parasitology**, v.150, p. 6–12, 2007.

PROVENCHER, J. F. Parasites and pollution: Why both matter to marine bird conservation in the North. **Arctic**, 66, p. 516–520.2013.

POULLE, M.L.; LE CORRE, M.; BASTIEN, M.; GEDDA, E.; FEARE, C.; JAEGER, A.; LAROSE, C.; SHAH, N.; VOOGT, N.; GÖPPER, B.; LAGADEC, E.; ROCAMORA, G.; GEERS, R.; AUBERT, D.; VILLENA, I.; LEBARBENCHON, C. Exposure of pelagic seabirds to *Toxoplasma gondii* in the Western Indian Ocean points to an open sea dispersal of this terrestrial parasite. **PLoS ONE**, v. 16, n. 8, p. e0255664, 2021.

RÊGO, W. M. F. D.; COSTA, J. G. L.; BARAVIERA, R. C. D. A.; PINTO, L. V.; BESSA, G. D. L.; LOPES, R. E. N.; SILVEIRA, J.A.G.; VITOR, R. W. Sarcocystidae in wild birds of southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, 2021.

RIMOLDI, G.; SPEER, B.; WELLEHAN JR, J. F.; BRADWAY, D. S.; WRIGHT, L.; REAVILL, D.; CHIN, R. P. An outbreak of *Sarcocystis calchasi* encephalitis in multiple psittacine species within an enclosed zoological aviary. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 6, p.775-781, 2013.

ROCCHIGIANI, G.; POLI, A.; NARDONI, S.; PAPINI, R.; MANCIANTI, F. *Neospora caninum* in Wild Waterfowl: Occurrence of Parasite DNA and Low Antibody Titers. **Journal of Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 142-145, 2017.

ROGERS, K.H.; ARRANZ-SOLÍS, D.; SAEIJ, J. P.; LEWIS, S.; METE, A. *Sarcocystis calchasi* and other Sarcocystidae detected in predatory birds in California, USA. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 17, p. 91-99, 2022.

ROSENTHAL, B. M. Zoonotic sarcocystis. **Research in Veterinary Science**, v.136, p. 151-157, 2021.

SABINO, U.; MORAIS, R.; DUCA, C. Diet of some passerines in south coast of Espírito Santo state, Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 57, p. 387-391, 2017.

SATO, A.P.; VAZ, F.F.; KONELL, A. L.; KOCH, M. O.; FERREIRA, R. F. SIPINSKI, E. A. B.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Survey of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* antibodies in wild red-tailed Amazon parrots (*Amazona brasiliensis*), **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, p. e017519, 2020.

SATO, A.P.; GOULART, M.A.; KONELL, A.L.; KOCH, M.O.; FONSECA, F.M.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Serosurvey of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* sp. in captive raptors and risk factors analysis. **Parasitology International**, v. 82, p. 102312, 2021.

SATO, A P.; SILVA, T.C.E.; PONTES, T.P.; SANCHES, A.W.D.; PRAKAS, P.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Molecular characterization of *Sarcocystis* spp. in seabirds from southern Brazil. **Parasitology International**, v. 90, p. 102595, 2022.

SEKERCIOGLU, C. H.; Increasing awareness of avian ecological function. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 21, n. 8, p. 464-471, 2006.

SERAFINI, P. P.; LUGARINI, C. Procellariiformes e outras aves de ambientes marinhos (albatroz, petrel, fragata, atobá, biguá, gaivota). In CUBAS, Z. S.; SILVA J. C. R.; CATÃO-DIAS J. L. **Tratado de animais selvagens - medicina veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2014.

SCHARES, G.; HEYDORN, A.O.; CUPPERS, A.; CONRATHS, F.J.; MEHLHORN, H. *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. **Parasitology Research** v. 87, p. 808–816, 2001.

SHAPIRO, K.; CONRAD, P. A.; MAZET, J. A. K.; WALLENDER, W. W.; MILLER, W. A.; LARGIER, J. L. Effect of estuarine wetland degradation on transport of *Toxoplasma gondii* surrogates from land to sea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p.6821–6828, 2010.

SHAPIRO, K.; BAHIA-OLIVEIRA, L.; DIXON, B.; DUMÈTRE, A.; DE WIT, L. A.; VANWORMER, E.; VILLENA, I. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*:

Oocysts in water, soil and food. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 15, p. e00049, 2019.

SHADBOLT, T.; POCKNELL, A.; SAINSBURY, A. W.; EGERTON-READ, S.; BLAKE, D. P. Molecular identification of *Sarcocystis wobeseri*-like parasites in a new intermediate host species, the white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*). **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1845-1850, 2021.

SILVA, M. A.; PENA, H. F. J.; SOARES, H. S.; AIZAWA, J.; OLIVEIRA, S.; ALVES, B. F.; Souza, D.S.; MELO, R.P.B.; GENNARI, S.M.; MOTA, R.A.; Silva, J.C.R. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from free-ranging and captive birds and mammals in Pernambuco state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, p. 481-487, 2018.

SLAPETA, J. R.; KOUDELA, B.; VOTÝPKA, J.; MODRÝ, D.; HOREJS, R.; LUKES, J. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **The Veterinary Journal**, v.163, n. 2, p.147-154, 2002.

SOARES, R. M.; LOPES, E. G.; KEID, L. B.; SERCUNDES, M. K.; MARTINS, J.; RICHTZENHAIN, L. J. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the *H. heydorni* RAPD fragment AP10. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 168-172, 2011.

SOARES, M.; SCHIEFLER, A. F. Reprodução de *Larus dominicanus* (AVES, Laridae), na Ilhota da Galeta, Laguna, SC, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v 8, n.1, p. 313-316, 1995.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed Guanabara Koogan, 2017.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii* from: animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, 1217-1258, 2000.

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-1. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org> (Acesso em outubro de 2020).

VALADAS, S.Y.; DA SILVA, J.I.; LOPES, E.G.; KEID, L.B.; ZWARG, T.; DE OLIVEIRA, A.S.; SANCHES, T.C.; JOPPERT, A.M.; PENA, H.F.; OLIVEIRA, T.M.; FERREIRA, H.L.; SOARES, R.M. Diversity of *Sarcocystis* spp. shed by opossums in Brazil inferred with phylogenetic analysis of DNA coding ITS1, cytochrome B, and surface antigens. **Experimental Parasitology**, v. 164, p. 71–78, 2016.

VANWORMER, E.; MILLER, M.A.; CONRAD, P.A.; GRIGG, M.E.; REJMANEK, D. CARPENTER, T. E.; MAZET, J. A. Using Molecular Epidemiology to Track *Toxoplasma gondii* from Terrestrial Carnivores to Marine Hosts: Implications for Public Health and Conservation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2852, 2014.

VIELLIARD, J. M. E. Bird community as an indicator of biodiversity: results from

quantitative surveys in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 72, n. 3, Rio de Janeiro, 2000.

VILLAGRA-BLANCO, R.; SILVA, L. M.; CONEJEROS, I.; TAUBERT, A.; HERMOSILLA, C. Pinniped-and cetacean-derived ETosis contributes to combating emerging apicomplexan parasites (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*) circulating in marine environments. **Biology**, v. 8, n. 1, p. 12, 2019.

VILLAR, D.; KRAMER, M.; HOWARD, L.; HAMMOND, E.; CRAY, C.; LATIMER, K. Clinical Presentation and Pathology of Sarcocystosis in Psittaciform Birds: 11 Cases **Avian Diseases**, v.52(1) p. 187-194, 2008.

VON DOHLEN A. R.; SCOTT, D.; DUBEY J. P.; LINDSAY D. S. Prevalence of *Sarcocysts* in the muscles of raptors from a rehabilitation center in North Carolina, **Journal of Parasitology**, v.105 p. 11-16, 2019.

VOTIER, S.C.; SHERLEY, R. B. Seabirds. **Current Biology**, v. 27, n. 11, p. R448-R450, 2017.

WIKI AVES - A Enciclopédia das Aves do Brasil. Disponível em: <https://www.wikiaves.com.br/>. Acesso em 25 de setembro de 2021.

WILSON, A. G., LAPEN, D. R., MITCHELL, G. W., PROVENCHER, J. F., & Wilson, S. Interaction of diet and habitat predicts *Toxoplasma gondii* infection rates in wild birds at a global scale. **Global Ecology and Biogeography**, v. 29, n. 7, p.1189-1198, 2020.

WORK, T. M.; MASSEY, J. G.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in three species of native and introduced Hawaiian birds. **Journal of Parasitology**, v. 88, n.5, p. 1040-1042, 2002.

WÜNSCHMANN, A., REJMANEK, D., CRUZ-MARTINEZ, L.; BARR B.C.; *Sarcocystis falcatula* associated encephalitis in a free-ranging great horned owl (*Bubo virginianus*), **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 283–287, 2009.

WÜNSCHMANN, A.; REJMANEK, D.; CONRAD, P.A.; HALL, N.; CRUZ-MARTINEZ, L.; VAUGHN, S.B.; BARRET, B. C. Natural Fatal *Sarcocystis Falcatula* Infections in Free-Ranging Eagles in North America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n.2, p. 282-289, 2010.

YAN, C., LIANG, L. J., ZHENG, K. Y., & ZHU, X. Q. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*, **Parasites and Vectors**, v.9, n. 137, p.1-7, 2016.

ZHANG, X.; ZHANG, N.; TIAN, W.; ZHOU, D.; XU, Y.; ZHU, X. First report of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in pet parrots in China. **Vector-Borne and Zoonotic Disease**, v.14, p.394-398, 2014.

ANEXO 1 – Certificado Comitê de Ética - CEUA UFPR



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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 061/2018, referente ao projeto “**Diagnóstico sorológico, molecular e isolamento in vitro de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis sp.* em aves**”, sob a responsabilidade **Rosângela Locatelli Dittrich** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 2 de invasividade, em reunião de 04/09/2018.

Vigência do projeto	Novembro/2018 até Dezembro/2021
Espécie/Linhagem	<i>Rapinantes, Psitacídeos, Aves Marinhas, Galiformes (ave)</i>
Número de animais	510
Peso/Idade	Variáveis
Sexo	Ambos
Origem	Falcoeiros de Curitiba, Refúgio Biológico Bela Vista, Parque das Aves, Instituto Ambiental do Paraná e Laboratório de Incubação de Animais, Brasil

- O pesquisador é responsável por fornecer os dados relativos ao número exato de animais utilizados no projeto em questão, tanto nos relatórios parciais e/ou no relatório final.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 061/2018, regarding the project “**Serologic, molecular diagnosis and in vitro isolation of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis sp.* in 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 2 of invasiveness, in session of 04/09/2018.

Duration of the project	November/2018 until December/2021
Specie/Line	<i>Rapinantes, Psitacídeos, Aves Marinhas, Galiformes (poultry)</i>
Number of animals	510
Wheight/Age	variable
Sex	variable
Origin	Falcoeiros de Curitiba, Refúgio Biológico Bela Vista, Parque das Aves, Instituto Ambiental do Paraná e Laboratório de Incubação de Animais, Brazil.

- The researcher is responsible for providing data on the exact number of animals used in the project in question, either in the partial reports and / or in the final report.

Curitiba, 04 de Setembro de 2018

Chayane da Rocha

Chayane da Rocha

Coordenadora CEUA-SCA

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

ANEXO 2 – Autorização SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 64096-2	Data da Emissão: 08/01/2020 16:42:46	Data da Revalidação*: 18/03/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Ana Paula Sato	CPF: 042.747.979-70
Título do Projeto: Diagnóstico sorológico e molecular de <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Neospora caninum</i> e <i>Sarcocystis</i> sp. em aves silvestres e isolamento de <i>Sarcocystis</i> sp. In vitro	
Nome da Instituição: Universidade Federal do Paraná	CNPJ: 75.095.679/0001-49

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de amostra, necropsia e análises laboratoriais	11/2018	11/2021
2	Coleta de amostras, necropsias, análises sorológicas, molecular, histopatológica e isolamento,	02/2020	02/2022

Observações e ressalvas

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

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

Código de autenticação: 0640960220200108

Página 1/4

ANEXO 3 – Ofício alteração do título do projeto



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

OFÍCIO Nº 030/2022

Para: Rosângela Locatelli Dittrich
Assunto: Protocolo 061/2018

Prezado(a) pesquisador(a),

Após avaliação da solicitação constante em ofício enviado em 03 de julho de 2022, acerca de projeto/aula sob sua responsabilidade, de protocolo número 061/2018 intitulado “**Diagnóstico sorológico, molecular e isolamento *in vitro* de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis sp. em aves*”**, a Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias – UFPR decidiu por concordar com as alterações solicitadas.

Sendo assim, o protocolo 061/2018 passa a vigorar com prazo de encerramento em 29/09/2022, sob título “**Diagnóstico sorológico, histopatológico e molecular de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis spp. em aves silvestres*”**, contando com utilização de 310 aves, às quais foram incluídas as ordens Phoenicopteriformes, Gruiformes, Passeriformes, Piciformes e Pelecaniformes.

Curitiba, 06 de julho de 2022.

Alex Maiorka
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais
AG - UFPR

