Ralph Eric Thijl Del Val Oñoro Vanstreels

**Estudo da malária aviária e outros hemoparasitas
em pinguins na costa atlântica da América do Sul**

São Paulo

2014

RALPH ERIC THIJL DEL VAL OÑORO VANSTREELS

**Estudo da malária aviária e outros hemoparasitas em pinguins
na costa atlântica da América do Sul**

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

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias

São Paulo

2014

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2955
FMVZ

Vanstreels, Ralph Eric Thijl Del Val Oñoro
Estudo da malária aviária e outros hemoparasitas em pinguins na costa atlântica da
América do Sul / Ralph Eric Thijl Del Val Oñoro Vanstreels. -- 2014.
250 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Catão Dias.

1. Epidemiologia. 2. Patologia. 3. *Plasmodium*. 4. Conservação. 5. Reabilitação. I. Título.

São Paulo, 19th February 2014

CERTIFIED

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da malária aviária e outros hemoparasitas em pinguins na costa atlântica da América do Sul", protocolado sob o CEUA nº 601415, utilizando 1000 Espécies silvestres brasileiras (1000 machos), sob a responsabilidade de José Luiz Catão Dias, foi aprovado na reunião de 19/02/2014, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "", protocol number CEUA 601415, utilizing 1000 Brazilian wild species (1000 males), under the responsibility José Luiz Catão Dias, was approved in the meeting of day 02/19/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

yours faithfully,

Denise Tabacchi Fantoni
Coordinator of the Ethic Committee on Animal Use
School of Veterinary Medicine and Animal Science
University of São Paulo

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: 20825-5	Data da Emissão: 13/02/2014 18:27	Data para Revalidação*: 15/03/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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: José Luiz Caetano Dias	CPF: 029.597.888-00
Título do Projeto: Estudo da malária aviária em Pinguins-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) recebidos em centros de reabilitação selecionados do litoral brasileiro e mantidos em instituições de cativeiro	
Nome da Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e envio de amostras biológicas	07/2009	12/2013
2	Coleta e envio de amostras biológicas	01/2014	01/2018

Observações e ressalvas

1	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 passado, 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.
2	Esta autorização NÃO exclui 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, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 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.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico: www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da 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 <i>in situ</i> .
6	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 subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspenso ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
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, bio prospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	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.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sob risco de extinção ou ameaçadas de sobre-explotação.

Outras ressalvas

1	A quantidade de sangue a ser coletada não deve ultrapassar 1% da massa corporal da ave, sendo este quantitativo suficiente para os objetivos pretendidos.
2	A quantidade de sangue a ser coletada não deve ultrapassar 1% da massa corporal da ave, sendo este quantitativo suficiente para os objetivos pretendidos.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	CLAUDIAN IBMEYER	Doubranda	282.611.748-32	264406576 SSP-SP	Brasileira
2	Juliana Yuri Savioili	Coleta de amostras biológicas	301.023.498-88	327703994 SAO PAULO-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 154/2007. Através do código de autenticação a baixo, 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: 23978182

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: 20825-5	Data da Emissão: 13/02/2014 18:27	Data para Revalidação*: 15/03/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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: José Luiz Caetano Dias	CPF: 029.597.888-00
Título do Projeto: Estudo da malária aviária em Pinguins-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) recebidos em centros de reabilitação selecionados do litoral brasileiro e mantidos em instituições de cativeiro	
Nome da Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

3	PATRICIA PEREIRA SERAFINI	Coleta de amostras biológicas	027.472.819-22	66214524 SSP-PR	Brasil
4	RODOLFO PINHO DA SILVA FILHO	Coleta de amostras biológicas	401.790.010-00	6006891032 SSP-RS-RS	Brasil
5	Sabrina Epiphani	Coordenadora adjunta	141.007.908-21	15570072 SSP-SP	Brasil
6	Claudia Carvalho do Nascimento	Coleta de amostras biológicas	269.215.078-31	28220355-2 SSP-SP	Brasil
7	Cristiane Kiyomi Miyaji Kolesnikova	Coleta de amostras biológicas	176.142.858-67	15481877 SSP-SP	Brasil
8	Ralph Eric Thijl Del Val Onoro Vansteenkiste	Doubrando	352.714.958-58	44041896-3 SSP-SP	Brasil
9	VANESSA MARQUES PEDROSO	Coleta de amostras biológicas	004.001.200-08	3061884271 SSP-RS	Brasil
10	PAULA LIMA CANABARRO	Coleta de amostras biológicas	961.135.420-00	2076552865 SJS-RS	Brasil
11	ANDRÉA CORRADO ADORNES	Coleta de amostras biológicas	535.371.810-00	2029731111 SSP-RS	Brasil
12	Silvia Bairy Gastal	Coleta de amostras biológicas	018.444.810-77	8080081981 SJS-RS	Brasil
13	ARYSE MORBRA MARTINS	Coleta de amostras biológicas	012.549.910-85	MG13269966 SSP-MG	Brasil
14	Cristiane Lassálvia Nascimento	Coleta de amostras biológicas	014.792.837-08	20939938 SSP-SP	Brasil
15	GUSTAVO HENRIQUE PEREIRA DUTRA	Coleta de amostras biológicas	273.007.978-57	246793260 SSP-SP	Brasil
16	Thiago Augusto do Nascimento	Coleta de amostras biológicas	304.758.368-47	243317372 SSP-SP	Brasil
17	Raphael Nogueira Ramos	Coleta de amostras biológicas	283.204.358-54	33254836-3 SSP-SP	Brasil
18	Ryszard Maradni	Coleta de amostras biológicas	169.546.928-32	243245579 SSP-SP	Brasil
19	Martha Lima Brandão	Coleta de amostras biológicas	029.282.627-38	101386106 IFPR-RJ	Brasil
20	ANGELA LEITZKE CABANA	Coleta de amostras biológicas	006.086.010-39	1073810301 SSP-RS	Brasil
21	Melissa Orzechowski Xavier	Coleta de amostras biológicas	964.912.530-68	6069748678 SJS-RS	Brasil
22	RENATA FERREIRA HURTADO	Coleta de amostras biológicas	323.144.298-26	439266896 SSP-SP	Brasil
23	Juliana Marigo	Pós-doubrando	255.015.058-94	28136736x SSP-SP	Brasil
24	Katia Regina Groch	Doubrando	739.751.419-72	9080491855 SSP-PA-RS	Brasil
25	Biana Raquel de Lima Mauro	Coordenadora adjunta	134.270.528-88	21588159-7 SSP-SP	Brasil
26	Jessica Donato Ribeiro	Coleta de amostras biológicas	364.651.708-00	430047770 SSP-SP	Brasil
27	VALERIA RUOPPOLO	Coordenadora adjunta e doutoranda	195.315.808-04	21416884-0 SSP-SP	Brasil

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 154/2007. 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: 23978182

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: 20825-5	Data da Emissão: 13/02/2014 18:27	Data para Revalidação*: 15/03/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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: José Luiz Caetano Dias	CPF: 029.597.888-00
Título do Projeto: Estudo da malária aviária em Pinguins-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) recebidos em centros de reabilitação selecionados do litoral brasileiro e mantidos em instituições de cativeiro	
Nome da Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

28	ANA CAROLINA EMBANK	Mestranda	317.712.058-73	307903163 SSP-SP	Brasil
29	malina von stöding dos reis	Coleta e processamento de amostras biológicas	299.527.228-18	289611970 SSP-SP	Brasil
30	Pedro Renato Gonçalves Riho	Coleta de amostras biológicas	027.050.320-02	5101642808 SUS-RS	Brasil
31	Laura Christlmeier Reisdorf	Coleta de amostras biológicas e mestranda	338.691.748-89	460923633 SSP-SP	Brasil

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		RS	Centro de Recuperação de Animais Marinhos, FURG (Rio Grande)	Fora de UC Federal
2		SC	CEIAS do Núcleo de Fauna do IBAMA (Florianópolis)	Fora de UC Federal
3		SP	CEIAS do Centro Universitário Monte Serrat (Santos)	Fora de UC Federal
4		SP	Aquário Municipal de Santos (Santos)	Fora de UC Federal
5		SP	Aquário Mundo Guarujá (Guarujá)	Fora de UC Federal
6		SP	Aquário de Peruibe (Peruibe)	Fora de UC Federal
7		SP	Aquário de São Paulo (São Paulo)	Fora de UC Federal
8		SP	Fund. Museu de História, Pesq. e Arg. do Mar (São Sebastião)	Fora de UC Federal
9		SP	Sabina Escola Parque do Conhecimento (São André)	Fora de UC Federal

Atividades X Taxons

#	Atividade	Taxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Spheniscidae
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Spheniscidae

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Animal encontrado morto ou partes (carcassa), bexiga, pele, Ecto-parasita, Fezes, Fragmento de tecido/orgão, Regurgitação/conteúdo estomacal, Sangue, Fecund, Outras amostras biológicas (Suares orais e cloacais)
2	Método de captura/coleta (Aves)	Outros métodos de captura/coleta (cativeiro)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	colecção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 154/2007. 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: 23978182

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: 20825-5	Data da Emissão: 13/02/2014 18:27	Data para Revalidação*: 15/03/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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: José Luiz Caetano Dias	CPF: 029.597.888-00
Título do Projeto: Estudo da malária aviária em Pinguins-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) recebidos em centros de reabilitação selecionados do litoral brasileiro e mantidos em instituições de cativeiro	
Nome da Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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: 23978182

Página 4/5

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: 20825-5	Data da Emissão: 13/02/2014 18:27	Data para Revalidação*: 15/03/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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: José Luiz Caetano Dias	CPF: 029.597.888-00
Título do Projeto: Estudo da malária aviária em Pinguins-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) recebidos em centros de reabilitação selecionados do litoral brasileiro e mantidos em instituições de cativeiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 154/2007. 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: 23978182

Página 5/5

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VANSTREELS, Ralph Eric Thijl Del Val Oñoro

Título: Estudo da malária aviária e outros hemoparasitas em pinguins na costa atlântica da América do Sul

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

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabajo a mi querida abuelita,
Angeles Oñoro Orozco,
de quien tengo orgullo de compartir sangre y espíritu.

AGRADECIMENTOS

ACKNOWLEDGEMENTS

Aos pinguins, por suportarem todos os incômodos que lhes causei com um número relativamente pequeno de bicadas e arranhões. Espero que meus esforços os ajudem a continuarem sua brava luta pela sobrevivência e que seu maravilhoso ambiente marinho persevere à nossa passagem pelo planeta. E aos pinguins que eutanaseiei e aos que não pude ajudar, que descansem em paz e me inspirem para que possa ajudar os que ficaram.

À minha família, amigos e amigas que me acompanham na jornada do doutorado e da vida. Em especial, à minha mãe Mary, minha irmã Chris, minha abuelita Angeles, as eternas mulheres da minha vida, e ao meu cunhado e amigo Celso. Ao meu pai Frans, que tanto me ensinou e continua me ensinando. À minha querida Renata Hurtado, sempre companheira e amada, que fez meus dias de doutorado mais felizes e inspirados e me ajudou e apoiou sempre nas horas mais críticas! E aos meus amigos Luis Sansoni e ao Luiz Panigassi que me acompanharam de perto e me apoiaram nessa longa jornada.

Ao Prof. Catão, por ser uma pessoa fantástica e o melhor orientador que eu poderia pedir. Por tolerar minhas excentricidades, me orientar nos momentos mais confusos e estar ao meu lado. É uma alegria e uma honra ter sido teu orientado. Obrigado por me *aceitar* e me *orientar*, nos sentidos mais plenos destas palavras!

À Valeria Ruoppolo, minha eterna co-orientadora e amiga, que nunca hesitou em me abrir todas as portas para que eu crescesse e aprendesse. Tudo de bom que alcancei ou alcançarei com os pinguins, será sempre consequência direta ou indireta do seu apoio e de minha admiração pela sua personalidade e competência.

Aos meus ídolos e professores, Andréa Adornes e Rodolfo Silva-Filho, pela amizade, pelas conversas sinceras e pelo apoio nos momentos mais difíceis. Por me ensinarem o que é o verdadeiro espírito da reabilitação de pinguins, e me mostrarem que com competência, seriedade e amor pelo trabalho é que se ajuda os animais.

À Profa. Sabrina Epiphanyo e às amigas Luana Ortolan, Michelle Sercundes e Silvia Portugal por me guiarem pelo mundo da biologia molecular e me ensinarem tantas coisas sobre malária dos mamíferos e que me deram muitos insights sobre a malária aviária nos pinguins. Trabalhar com biologia molecular não apenas requer profundo conhecimento e experiência, mas também uma fé inabalável na ciência!

À Profa. Érika Braga e aos amigos Francisco Ferreira e Nayara Belo pela ajuda e aprendizado nos mistérios do sequenciamento genético e pelas aventuras na identificação morfológica dos esfregaços. Acredito que ainda teremos um longo caminho juntos no estudo desses parasitas tão complicados!

À Profa. Eliana Faquim e às amigas Camila Bizelli, Jéssica Costa, Marina Atzinger e Sandriana Ramos pela ajuda imensa e essencial no mundo da imunologia, por encararem comigo esse desafio e emprestarem seu conhecimento e sua energia para ajudarmos essas aves. Foi uma parceria de mundo tão afastados que nos mostrou como podemos colher frutos maravilhosos quando trabalhamos juntos!

Aos Profs. Marcos Amaku e José Grisi-Filho pelo apoio nas análises dos dados, por me ajudarem a encontrar um caminho seguro no mundo estatístico nos momentos de incerteza.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens (LAPCOM): Profa. Eliana Matushima, Alexander Genoy-Puerto, Alice Oliveira, Angélica Sarmiento, Camila Molina, Carlos Sacristan, Catia Dejuste, Fabíola Prioste, Gustavo Bauer, Juliana Marigo, Kátia Groch, Marcelo Carvalho, Marina Bueno, Marina César, Omar Gonzalez-Viera, Pedro Oliveira, Renata Santos, Rosely Di Chiacchio, Samira Costa, Sávio Sant'Anna, Silmara Rossi, Stefanie Santos, Ticiane Zwarg, Thatiana Sanches e todos os visitantes, estagiários e colaboradores. E, em especial, ao Jorge Oyakawa por toda a ajuda e por impedir que implodíssemos o laboratório semanalmente! Pelas suas ajudas e companhia, sempre tivemos um ambiente de amizade e companheirismo que foi essencial para minha evolução pessoal e profissional!

Aos amigos do Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-FURG): Alice Meirelles-Leite, Aryse Martins, Lauro Barcellos, Paula Canabarro, Pedro Bruno-Filho, Roberta Petitet, Silvia Gastal, Vanessa Pedroso e todos os estagiários e voluntários. Tudo o que aprendi com vocês e todas as ajudas e colaborações não se pode pagar, mas prometo que me esforçarei ao máximo! Obrigado pela amizade e pelo apoio integral, me sinto honrado pela oportunidade de ter conhecido e aprendido tanto com vocês.

A Cristiane Kolesnikovas e aos amigos da Associação R3 Animal e do CETAS Florianópolis, em especial Ariana Fernandes, Patrícia Serafini e todos os estagiários e voluntários. A colaboração de vocês foi muito importante para aprendermos juntos, e sou um grande admirador da luta de vocês pela reabilitação da fauna silvestre. A luta de vocês é difícil mas belíssima, e vocês têm meu apoio sempre que precisarem!

Aos amigos e parceiros da Aiuká, em especial Claudia Nascimento, Gelza Soares, Juliana Saviolli, Leo Francini, Paulo Valobra e Pedro Renato Gonçalves. Parabéns pelo trabalho de excelência e obrigado pela valiosa colaboração pela conservação dos pinguins, espero que possamos continuar juntos por muitos anos mais!

Aos amigos dos Aquários de Guarujá, Santos, São Paulo, Peruíbe e Parque Sabina, em especial a Bruna Schwarz, Cristiane Lassálvia, Gustavo Dutra, Jéssica Ribeiro, Laura Ippólito, Laura Reisfeld, Pryscilla Maracini, Raphael Ramos e Thiago Nascimento. Vocês são prova de que, através do esforço pessoal e da competência, o cativo pode se envolver e contribuir à conservação da natureza.

Aos amigos do Instituto de Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos (IPRAM), em especial a Elaine Cruz, Laila Medeiros, Luis Felipe Mayorga, Renata Bhering e Tainan Oliveira. Agradeço as colaborações e desejo muita sorte aos seus esforços em ajudar os pinguins!

Aos amigos da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ) e da Wildlife Conservation Society, pela colaboração no estudo dos pinguins através do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR), em especial Ana Olívia Reis, Erli Costa, Flavia Miranda, Maria Virginia Petry, Roberta Piuco e Victor Valiati. Que este seja apenas o começo numa longa série de colaborações para o estudo e conservação dos pinguins antárticos!

Às amigas da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Ângela Cabana e Melissa Xavier, pelas colaborações na eterna missão de desvendar os mistérios da aspergilose. Continuemos com a batalha e quem sabe um dia venceremos esse fungo tão teimoso e possamos ajudar outros tantos pinguins.

A las amigas de Wildlife Conservation Society, Marcela Uhart y Virginia Rago, que me recibieron tan bien en nuestras colaboraciones y a quien aprendí a admirar muchísimo. Congratulaciones por vuestra competencia y calidad del trabajo, es un honor y una alegría trabajar con ustedes!

A los amigos de la Fundación Mundo Marino, David Verón, Félix Capellino, Gastón Delgado, Julio Loureiro y Sérgio Heredia, por me trataren como un hermano y me recibieren como si estuviera en mi casa. Mucha suerte y seguimos luchando por estos bichos!

To Dr. Eric Woehler for welcoming me to Tasmania and giving me the opportunity to participate in some of your outstanding research and conservation efforts. I look forward to continue learning from you for many years to come!

To all the friends in Tasmania and mainland Australia who have been so kind and made me feel at home even at the other side of the world! I am hugely thankful to the friends and colleagues at the University of Tasmania (Cecilia Villanueva, Mark Hindell, Natalie Bool, Perviz Marker, Stewart Nicol), Phillip Island Nature Park (Andre Chiaradia, Annett Finger, Leanne Renwick, Paula Wasiak, Peter Dann), New South Wales Office of Environment and Heritage (David Pridell, Nicholas Carlile), South Bruny Nature Park (Alena Hrasky, Peter Lingard), and to Caitlin Vertigan and Jason Jones. And, in particular I am hugely thankful to Peter Vertigan: I cannot overstate what an incredible person you are, thank you so much for all the help!

To the friends at the Southern African Foundation for the Conservation of Coastal Birds (SANCCOB): Margaret Roestorf, Nola Parsons, Venessa Strauss and all the staff members, interns and volunteers. You have taught me so much and encouraged me to believe that well-intentioned people can unite and work together regardless how wide the oceans that separate them!

To the friends at International Fund for Animal Welfare and International Bird Rescue, in particular Barbara Callahan and Jay Holcomb. I deeply admire your competence and history, and am hugely thankful for the opportunities and lessons you have given me!

Aos amigos Claudio Arroyo e Luciano Bugalho do Laboratório de Histopatologia da FMVZ-USP pelos inúmeros galhos quebrados, ajudas e aprendizado!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado direto (BP.DD 2009/53956-9) e pelo auxílio à pesquisa (AP.BTA.TEM 2010/51801-5), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior (BEX 12505/12-9). À Profa. Margareth Capurro-Guimarães e à Ticiania Zwarg por cederem os controles positivos utilizados neste trabalho.

E, por fim, aos inúmeros colegas e amigos que me ajudaram direta ou indiretamente a aprender sobre os pinguins e seus parasitas e a conduzir meu projeto de pesquisa. Pequenos conselhos e conversas aqui e ali fazem toda a diferença, e foram a origem de algumas das melhores ideias e do maior encorajamento para levar adiante esse trabalho!

***“I have often had the impression that, to penguins,
man is just another penguin...
different, less predictable, occasionally violent,
but tolerable company when he sits still and minds his own business.”***

- Bernard Stonehouse

RESUMO

VANSTREELS, R. E. T. D. V. O. **Estudo da malária aviária e outros hemoparasitas em pinguins na costa atlântica da América do Sul.** [Investigation of avian malaria and other blood parasites in penguins along the Atlantic coast of South America]. 2014. 250 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Embora não existam colônias reprodutivas de pinguins na costa do Brasil, o país é uma importante área de invernada para o pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), uma espécie nativa do sul da América do Sul. Quando encontradas debilitadas em praias brasileiras, estas aves são comumente levadas a centros de reabilitação especializados para receber cuidados veterinários e, posteriormente, serem liberadas à natureza. Durante esta permanência em reabilitação, no entanto, enfermidades infecciosas como a malária aviária podem ser importantes limitantes à recuperação destas aves. A malária aviária é uma enfermidade causada por protozoários do gênero *Plasmodium* (Apicomplexa: Haemosporida), veiculados às aves por meio da picada de mosquitos. Enquanto estes parasitas são relativamente pouco patogênicos para a maioria das espécies aviárias, algumas aves como os pinguins são excepcionalmente mais suscetíveis a estes patógenos, podendo constituir uma significativa ameaça à sua conservação. O presente estudo investiga a ocorrência de *Plasmodium* spp. e outros hemoparasitas em pinguins-de-Magalhães em centros de reabilitação na costa brasileira, assim como outras espécies de pinguins em vida livre nas Ilhas South Shetland. Métodos diagnósticos morfológicos (esfregaços sanguíneos, histopatologia) e moleculares (reação em cadeia de polimerase aninhada, sequenciamento genético) foram utilizados para estudar pinguins reabilitados em diferentes instituições em seis estados do Brasil entre 1999 e 2013. Um surto de malária aviária particularmente relevante foi estudado em detalhes em um centro de reabilitação em Florianópolis, SC, tendo sido demonstrado o envolvimento de três diferentes linhagens de *Plasmodium* spp. em um único evento epizootico, com elevada morbidade e mortalidade. Além disto, a ocorrência de *Plasmodium* spp. foi documentada em pinguins-de-Magalhães em centros de reabilitação ao longo de grande parte da costa brasileira, do extremo sul do Rio Grande do Sul à Bahia, com uma prevalência estimada entre 6.6% e 13.5%. Estas

infecções apresentam marcante sazonalidade, incidindo exclusivamente nos meses mais quentes do ano (outubro a abril), e podem envolver uma grande variedade de linhagens de *Plasmodium* spp., algumas das quais nunca haviam sido reportadas em pinguins como *P. cathemerium*, *P. nucleophilum* e *P. tejerai*. Em contraste não foram encontrados hemoparasitas em pinguins amostrados nas Ilhas South Shetland, um achado consistente com estudos anteriores. À parte destas investigações epidemiológicas, foi realizada uma extensa revisão e compilação dos aspectos da literatura científica acerca desta enfermidade e outras hemoparasitoses em pinguins buscando estabelecer um panorama mais claro acerca da sua distribuição geográfica e implicações epidemiológicas e para a conservação. Com base nisto, torna-se possível desenvolver uma discussão crítica do atual estado da arte e apontar as atuais lacunas de conhecimento que possam direcionar estudos futuros. Em suma, a malária aviária é uma enfermidade relevante para as mais diversas espécies de pinguins em todo o mundo, e possui particular importância para a reabilitação e conservação destas aves na América do Sul.

Palavras-chave: Epidemiologia. Patologia. *Plasmodium*. Conservação. Reabilitação.

ABSTRACT

VANSTREELS, R. E. T. D. V. O. **Investigation of avian malaria and other blood parasites in penguins along the Atlantic coast of South America.** [Estudo da malária aviária e outros hemoparasitas em pinguins na costa atlântica da América do Sul]. 2014. 250 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Despite no penguin breeding colonies along the Brazilian coast, the country is an important wintering area for the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*), a species native to the south of South America. When Magellanic penguins are found alive ashore on Brazilian beaches, they are taken to rehabilitation centers to receive veterinary care and then are released back into the wild. However, while in rehabilitation, infectious diseases such as avian malaria may become important limiting factors for the recovery of these birds. Avian malaria is a disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium* (Apicomplexa: Haemosporida), which are transmitted to birds through mosquitoes. While these parasites are relatively non-pathogenic for most avian species, some birds such as penguins are exceptionally susceptible, such that *Plasmodium* poses a significant conservation threat. This study investigates the occurrence of *Plasmodium* spp. and other blood parasites in Magellanic penguins at rehabilitation centers along the coast of Brazil, and in other species of penguins at the South Shetland Islands, South Atlantic Ocean. In Brazil, a combination of morphological (blood smears, histopathology) and molecular (nested polymerase chain reaction, gene sequencing) diagnostic methods were employed to investigate the presence of haemoparasites in penguins undergoing rehabilitation in six states between 1999 and 2013. A particularly significant avian malaria outbreak was studied in detail at a rehabilitation center in Florianópolis, SC, where the involvement of three distinct *Plasmodium* spp. in a single epizootic event was demonstrated, with resultant high morbidity and mortality. The occurrence of *Plasmodium* spp. was documented in Magellanic penguins at rehabilitation centers along most of the Brazilian coast, from southernmost Rio Grande do Sul to Bahia, with an estimated prevalence between 6.6% and 13.5% of captive penguins. These infections were markedly seasonal, with the incidences exclusively restricted to the warmer months of the year (October to April),

and involving a broad variety of *Plasmodium* spp. lineages, some of which had not yet been reported in penguins, such as *P. cathemerium*, *P. nucleophilum* and *P. tejerai*. In contrast, no blood parasites were detected in the penguins sampled at the South Shetland Islands, a finding that is consistent with previous studies. Aside from these epidemiological investigations, an extensive revision and compilation of the scientific literature was conducted for this disease and other penguins' haemosporidiosis, aiming to establish an integrated understanding of their geographic distribution and epidemiological and conservation implications. On this basis, it is possible to critically examine the state of the art and identify knowledge gaps that can be addressed in future studies. Avian malaria is a significant disease and conservation threat for most penguin species throughout the world, and has particular importance for the rehabilitation and conservation of penguins in South America.

Key-words: Epidemiology. Pathology. *Plasmodium*. Conservation. Rehabilitation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Ilustrações, nomes populares e científicos das espécies de pinguins.....	42
Figura 2.2 - Distribuição geográfica das colônias reprodutivas de pinguins.....	45
Figura 2.3 - Diagrama do ciclo anual de vida do pinguim-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>).....	46
Figura 2.4 - Fases do ciclo anual de vida do pinguim-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>).....	48
Figura 2.5 - Características oceanográficas do mar Patagônico.....	50
Figura 2.6 - Distribuição geográfica das áreas de reprodução e alimentação do pinguim-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>).....	51
Figura 3.1 - Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp. que infectam aves.....	70
Figura 3.2 - Ciclo de vida de <i>Leucocytozoon</i> spp.....	71
Figura 3.3 - Insetos hematófagos que atuam como hospedeiros de hemosporidianos aviários.....	73
Figura 3.4 - Distribuição do número de espécies registradas de hemosporidianos nas diversas ordens aviárias.....	74
Figura 3.5 - Distribuição do número de espécies registradas de hemosporidianos aviários, e respectivas prevalências médias, em função das regiões biogeográficas.....	77
Figura 3.6 - Diagrama conceitual da evolução da parasitemia na prima-infecção plasmódica de uma ave suscetível.....	80
Figura 3.7 - Lesões palpebrais associadas a picadas de mosquitos em pinguim-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>).....	84
Figura 3.8 - Achados necroscópicos típicos de malária aviária em pinguins.....	85
Figura 3.9 - Refringência dos grânulos de hemozoína à microscopia de luz polarizada.....	87

Figura 3.10 - <i>Plasmodium</i> spp. em esfregaços sanguíneos delgados de pinguim-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) (Giemsa).....	88
Figura 3.11 - <i>Haemoproteus</i> sp em esfregaço sanguíneo delgado de corujinha-do-mato (<i>Megascops choliba</i>) (Rosenfeld).....	88
Figura 3.12 - <i>Leucocytozoon tawaki</i> em esfregaço sanguíneo delgado de pinguim-Africano (<i>Spheniscus demersus</i>) (Diff-Quick).....	89
Figura 3.13 - Exemplos de artefatos e sujidades que podem assemelhar-se a hemoparasitas em esfregaços sanguíneos delgados.....	90
Figura 3.14 - <i>Babesia peircei</i> em esfregaço sanguíneo delgado de pinguim-Africano (<i>Spheniscus demersus</i>) (Diff-Quick).....	90
Figura 3.15 - Meronte tecidual de <i>Plasmodium</i> sp em corte histológico de baço de pinguim-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) (Hematoxilina-Eosina).....	92
Figura 3.16 - Merontes teciduais de <i>Plasmodium</i> sp em decalque tecidual de rim de pinguim-Africano (<i>Spheniscus demersus</i>) (Diff-Quick).....	93
Figura 3.17 - Instalação de telas anti-mosquito para a prevenção da malária aviária em espécies altamente suscetíveis.....	97
Figura 3.18 - Uso de repelentes de mosquito tipo <i>roll-on</i> aplicados à cabeça de pinguins como estratégia para prevenir a malária aviária.....	99

LISTA DE FIGURAS EM LINGUA INGLESA

Figure 4.1 - Host distribution of intracellular blood parasites among penguin species.....	112
Figure 4.2 - Geographic distribution of records of intracellular blood parasites in penguins (A) and of the sampling effort of studies investigating blood parasites in wild penguins (B). Blue areas correspond to the distribution of penguin breeding colonies.....	113
Figure 4.3 - Geographic distribution of records of intracellular blood parasites in penguins in relation to their confirmed or presumed invertebrate hosts. Blue areas correspond to the distribution of penguin breeding colonies.....	114
Figure 4.4 - Latitudinal distribution of breeding penguins (gray bars, lower axis) and penguins sampling effort of studies investigating blood parasites in wild penguins through different diagnostic methods (colored bars, upper axis).....	135
Figure 5.1 - Maximum likelihood phylogenetic tree of the mitochondrial cytochrome b gene of the studied hemosporidian lineages. Lineages identified in this study are emphasized in blue. When available, information on the morphospecies observed on the corresponding blood smear is provided. Branch lengths are drawn proportionally to evolutionary distance (scale bar is shown). Lower bootstrap values (< 50) are omitted.....	179
Figure 5.2 - Blood parasites in Giemsa-stained blood smears from Magellanic penguins (<i>Spheniscus magellanicus</i>).....	181
Figure 5.3 - Tissue meronts of <i>Plasmodium</i> (<i>Haemamoeba</i>) <i>tejerai</i> in tissues of Magellanic penguins (<i>Spheniscus magellanicus</i>). Hematoxylin-Eosin, penguin 584.....	183
Figure 6.1 - Geographic distribution of the sampling effort, detection and lineages of <i>Plasmodium</i> spp. in Magellanic penguins (<i>Spheniscus magellanicus</i>) undergoing rehabilitation along the coast of Brazil. Pie charts represent sampling effort (size) and percentage of positive results (red fraction). Blue areas represent the breeding (light blue) and historical foraging (darker blue) distribution of Magellanic penguins.....	203

Figure 6.2 - Monthly distribution of the incidence of <i>Plasmodium</i> infections in comparison to the number of penguins undergoing rehabilitation.....	208
Figure 6.3 - Phylogenetic tree of the <i>Plasmodium</i> spp. lineages identified in Magellanic penguins undergoing rehabilitation along the coast of Brazil (red), published penguin-infecting lineages (blue) and reference lineages. Branch lengths are drawn proportionally to the amount of changes (scale bar is shown). Bootstrap values lower than 20 are omitted.....	213
Figure 6.4 - Histological findings associated with avian malaria in Magellanic penguins (<i>Spheniscus magellanicus</i>). Hematoxylin-Eosin. Scale bars = 15 μ m.....	214

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 - Distribuição geográfica, população estimada, tendência demográfica e estado de conservação das espécies de pinguins.....	43
Quadro 3.1 - Sumário comparativo dos gêneros de hemosporidianos aviários.....	65
Quadro 3.2 - Lista de espécies de hemosporidianos aviários registrados na região Neotropical.....	78
Quadro 3.3 - Protocolos terapêuticos para hemosporidioses aviárias.....	102

LISTA DE QUADROS EM LINGUA INGLES

Table 5.1 - Individual history and diagnostic results for the studied Magellanic penguins (<i>Spheniscus magellanicus</i>). Taxonomic names within brackets indicate the taxon to which the species is presumed to correspond on the basis of phylogenetic analyses. Asterisks indicate individuals that died during the outbreak.....	172
Table 5.2 - Estimates of evolutionary distance (% expected base substitutions per site) of cytochrome b mitochondrial gene sequences of hemosporidians identified in penguins in this study (1-6) and the literature (7-10), and reference lineages from the MalAvi database (11-19). Values lower than 4.0 are highlighted.....	180
Table 5.3 - Hematological results and quantification of blood parasites in blood smears (Mean $\pm$ S.D.).....	184
Table 6.1 - Sample sizes examined using different diagnostic tests to screen for <i>Plasmodium</i> sp infections. Values within brackets indicate the number of positive samples. “†” indicates that sample collection was systematic, i.e. was not conducted in a manner that would favor sick or healthy individuals. “‡” indicates the collection of samples from penguins were rehabilitated at other facilities then transferred to Rio Grande do Sul but samples were collected upon arrival from transference.....	204
Table 6.2 - Details of the diagnostic results in relation to sample collection and testing strategy, age group, oiling and survival.....	210
Table 7.1 - Differential leukocyte counts (Mean $\pm$ S.D.) for penguins at Demay Point (DP), Keller Peninsula (KP) and Stinker Point (SP), January-February 2011.....	237

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	análise de variância (<i>analysis of variance</i>)
APs	pinguins-africano (<i>African penguins</i>)
CETAS	Centro de Triagem de Animais Silvestres
CRAM-FURG	Centro de Recuperação de Animais Marinhos da Universidade Federal do Rio Grande
DNA	ácido desoxirribonucleico
EELC	células jovens da linhagem eritrocítica (<i>early erythrocytic lineage cells</i>)
ELISA	ensaio imunoenzimático
FUNDAMAR	Fundação Museu de História Pesquisa e Arqueologia do Mar
HLR	Razão heterófilo-linfócito (<i>heterophil-to-lymphocyte ratio</i>)
HP	histopatologia (<i>histopathology</i>)
Ig	imunoglobulina
IPRAM	Instituto de Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos
Is.	Ilha (<i>Island</i>)
MPs	pinguins-de-Magalhães (<i>Magellanic penguins</i>)
NZ	Nova Zelândia
PCR	reação em cadeia da polimerase
PCV	hematócrito (<i>packed cell volume</i>)
PROANTAR	Programa Antártico Brasileiro
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal
SANCCOB	<i>Southern African Foundation for the Conservation of Coastal Birds</i>
TBS	esfregaço sanguíneo delgado (<i>thin blood smear</i>)
TIS	decalque tecidual (<i>tissue impression smear</i>)
SCAR	Comitê Científico sobre Pesquisa Antártica (<i>Scientific Committee on Antarctic Research</i>)

LISTA DE ESPÉCIES

<u>Nome científico</u>	<u>Nome popular</u>	<u>Nome em língua inglesa</u>
<i>Aptenodytes forsteri</i>	Pinguim-imperador	Emperor penguin
<i>Aptenodytes patagonicus</i>	Pinguim-rei	King penguin
<i>Eudyptes chrysocome</i>	Pinguim-de-penacho-amarelo-do-Sul	Southern rockhopper penguin
<i>Eudyptes chrysolophus</i>	Pinguim-Macaroni	Macaroni penguin
<i>Eudyptes moseleyi</i>	Pinguim-de-penacho-amarelo-do-Norte	Northern rockhopper penguin
<i>Eudyptes pachyrhynchus</i>	Pinguim-de-Fiordland	Fiordland penguin
<i>Eudyptes robustus</i>	Pinguim-de-Snares	Snares penguin
<i>Eudyptes schlegeli</i>	Pinguim-royal	Royal penguin
<i>Eudyptes sclateri</i>	Pinguim-de-crista-ereta	Erect-crested penguin
<i>Eudyptula minor</i>	Pinguim-azul	Little penguin
<i>Megadyptes antipodes</i>	Pinguim-de-olhos-amarelos	Yellow-eyed penguin
<i>Pygoscelis adeliae</i>	Pinguim-de-Adélia	Adélie penguin
<i>Pygoscelis antarcticus</i>	Pinguim-antártico	Chinstrap penguin
<i>Pygoscelis papua</i>	Pinguim-papua	Gentoo penguin
<i>Spheniscus demersus</i>	Pinguim-africano	African penguin
<i>Spheniscus humboldti</i>	Pinguim-de-Humboldt	Humboldt penguin
<i>Spheniscus magellanicus</i>	Pinguim-de-Magalhães	Magellanic penguin
<i>Spheniscus mendiculus</i>	Pinguim-de-Galápagos	Galapagos penguin

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	33
1.1	APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS.....	35
	REFERÊNCIAS	37
2	CONSIDERAÇÕES ACERCA DA BIOLOGIA E ECOLOGIA DOS PINGUINS	41
2.1	INTRODUÇÃO	41
2.2	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	44
2.3	CICLO DE VIDA	46
2.4	OCORRÊNCIA NO BRASIL	59
2.5	ENFERMIDADES RELEVANTES PARA A CONSERVAÇÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
3	MALÁRIA AVIÁRIA E OUTROS HEMOSPORIDIANOS AVIÁRIOS	64
3.1	INTRODUÇÃO	64
3.2	ETIOLOGIA	65
3.3	EPIZOOTIOLOGIA.....	67
3.3.1	Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> e <i>Haemoproteus</i>.....	68
3.3.2	Ciclo de vida de <i>Leucocytozoon</i>.....	70
3.4	EPIDEMIOLOGIA.....	72
3.4.1	Distribuição nos hospedeiros invertebrados	72
3.4.2	Distribuição nas aves hospedeiras	74
3.4.3	Distribuição geográfica, sazonalidade e sincronicidade.....	76
3.5	PATOGENIA.....	78
3.6	CLÍNICA E DIAGNÓSTICO	82
3.6.1	Sinais clínicos.....	83
3.6.2	Achados necroscópicos	85
3.6.3	Esfregaço delgado	86

3.6.4	Histopatologia.....	91
3.6.5	Decalques teciduais	93
3.6.6	Diagnóstico molecular.....	93
3.6.7	Inoculação experimental.....	94
3.6.8	Outras técnicas diagnósticas.....	95
3.7	PREVENÇÃO	96
3.7.1	Tela anti-mosquitos.....	96
3.7.2	Ventiladores	98
3.7.3	Repelentes	98
3.7.4	Profilaxia medicamentosa	99
3.7.5	Monitoramento com esfregaços delgados	101
3.7.6	Vacinação.....	101
3.8	TRATAMENTO.....	102
	REFERÊNCIAS.....	104

4	INTRACELLULAR BLOOD PARASITES OF PENGUINS: A CRITICAL REVIEW AND META-ANALYSIS	110
4.1	ABSTRACT	110
4.2	INTRODUCTION	110
4.3	<i>BABESIA</i> (BABESIOSIS)	115
4.3.1	Species recorded in penguins	115
4.3.2	Distribution among penguin hosts	115
4.3.3	Invertebrate hosts and geographic distribution.....	116
4.3.4	Epidemiology and pathology	116
4.4	<i>HAEMOPROTEUS</i> (HAEMOPROTEOSIS)	117
4.4.1	Species recorded in penguins	117
4.4.2	Distribution among penguin hosts	118
4.4.3	Invertebrate hosts and geographic distribution.....	119
4.4.4	Epidemiology and pathology	119

4.5	<i>LEUCOCYTOZOOM</i> (LEUCOCYTOZOONOSIS)	120
4.5.1	Species recorded in penguins	120
4.5.2	Distribution among penguin hosts	121
4.5.3	Invertebrate hosts and geographic distribution	121
4.5.4	Epidemiology and pathology	122
4.6	<i>PLASMODIUM</i> (AVIAN MALARIA)	124
4.6.1	Species recorded in penguins	124
4.6.2	Distribution among penguin hosts	126
4.6.3	Invertebrate hosts and geographic distribution	127
4.6.4	Epidemiology and pathology	129
4.7	STUDIES WITH INCONCLUSIVE/QUESTIONABLE RESULTS	133
4.8	CONSIDERATIONS ON STUDY METHODS AND FUTURE STUDIES	135
4.9	IMPLICATIONS FOR CONSERVATION	137
	REFERENCES	139
	APPENDIXES	159
 5	 OUTBREAK OF AVIAN MALARIA ASSOCIATED TO MULTIPLE SPECIES OF <i>PLASMODIUM</i> IN MAGELLANIC PENGUINS UNDERGOING REHABILITATION IN SOUTHERN BRAZIL	 168
5.1	ABSTRACT	168
5.2	INTRODUCTION	169
5.3	METHODS	170
5.3.1	Ethics statements	170
5.3.2	Study population and sample collection	170
5.3.3	Laboratory procedures	173
5.3.4	Cytochrome b amplification and phylogenetic analysis	173
5.3.5	Statistical analyses	175
5.4	RESULTS	176
5.4.1	Clinical signs and necropsy findings	176
5.4.2	Hemosporidian detection	176
5.4.3	Parasite identification and phylogeny	177

5.4.4	Hematology and pathology	182
5.5	DISCUSSION	185
	REFERENCES	190
	APPENDIXES	198

6	EPIDEMIOLOGY AND PATHOLOGY OF AVIAN MALARIA IN MAGELLANIC PENGUINS UNDERGOING REHABILITATION ALONG THE COAST OF BRAZIL.....	200
6.1	ABSTRACT	200
6.2	INTRODUCTION	200
6.3	METHODS.....	201
6.3.1	Study locations and data collection	201
6.3.2	Study design	203
6.3.3	Sample collection, hematology and pathology	205
6.3.4	Molecular biology and phylogenetic analysis	206
6.3.5	Statistical analysis	207
6.4	RESULTS	207
6.4.1	Epidemiology in systematically sampled and PCR-tested individuals	209
6.4.2	<i>Plasmodium</i> species and lineages	209
6.4.3	Pathology	211
6.5	DISCUSSION	215
6.5.1	Epidemiology of avian malaria in penguins at rehabilitation centers	214
6.5.2	<i>Plasmodium</i> lineages infecting penguins and their pathology	217
6.5.3	Concurrent diseases	219
6.5.4	Implications for rehabilitation and conservation	220
	REFERENCES	222
	APPENDIXES	227

7	INVESTIGATION OF BLOOD PARASITES OF PYGOSCELID PENGUINS AT THE KING GEORGE AND ELEPHANT ISLANDS, SOUTH SHETLANDS ARCHIPELAGO, ANTARCTICA	232
7.1	ABSTRACT	232
7.2	INTRODUCTION	233
7.3	MATERIALS AND METHODS.....	234
7.4	RESULTS	236
7.5	DISCUSSION	237
	REFERENCES	240
 8	 CONSIDERAÇÕES FINAIS	 244
	 APÊNDICE	 247

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os pinguins são aves únicas. Além de seu particular carisma e seu significado cultural como símbolos dos ecossistemas polares, os pinguins compõem entre 50 e 80% de toda a biomassa de aves do Oceano Antártico, desempenhando um papel vital de transferência energética entre os ambientes marinho e terrestre no Hemisfério Sul (AINLEY, 1985; COOPER; WOEHLER, 1994). Por isto, os pinguins estão intimamente ligados ao equilíbrio do ambiente marinho e são suscetíveis às alterações ambientais que nele ocorram, servindo como indicadores precoces de impactos ambientais e desequilíbrios ecológicos no ambiente marinho (BOERSMA, 2008).

Embora seja residente da Argentina, Ilhas Falklands/Malvinas e Chile e não se reproduza na costa brasileira, o pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) pode ser encontrado às centenas ou milhares todos os anos ao longo do litoral brasileiro, sobretudo nas regiões Sul e Sudeste durante o inverno (CEMAVE, 2011; STOKES et al., 2014). Em muitos casos, pinguins enfermos poderão ser resgatados ainda com vida e encaminhados a centros de reabilitação especializados para receberem tratamento veterinário e, uma vez recuperados, serem liberados à natureza (RUOPPOLO et al., 2004a; HEREDIA et al., 2008). Estas iniciativas de reabilitação são importantes não apenas para mitigar a mortalidade destas aves que está direta ou indiretamente relacionada aos impactos antrópicos sobre o ambiente marinho (RUOPPOLO et al., 2004a; GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2006, 2010), mas também são vitais para garantir que estas aves recebam atendimento adequado e eticamente responsável, além de evitar que o público leigo, em suas tentativas bem intencionadas de resgatar estes animais carismáticos, seja exposto ao risco de lesões ou enfermidades zoonóticas (ESTES, 1998). Apesar da frequência com que pinguins mortos ou enfermos são encontrados na costa brasileira, ainda há relativamente poucos dados sobre as doenças e as causas de mortalidade destas aves em nosso litoral (TOURINHO et al., 2010; BRANDÃO et al., 2011). Além disto, durante o período de permanência nos centros de reabilitação, as enfermidades que podem atingir estas

aves e prejudicar sua sobrevivência e reabilitação são numerosas e relativamente pouco compreendidas (CLARKE; KERRY, 1993; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2007).

Dentre as enfermidades infecciosas, a malária aviária tem sido considerada uma das mais preocupantes ameaças para a conservação dos pinguins devido ao seu desenvolvimento rápido e mortalidade elevada (CLARKE; KERRY, 1993; JONES; SHELLAM, 1999b; LEVIN; PARKER, 2011). Causada por protozoários *Plasmodium* spp. veiculados por mosquitos, a malária aviária é relativamente assintomática para a maioria das aves, tornando-se porém significativamente patogênica em espécies aviárias que não co-evoluíram com estes hemoparasitas, como os pinguins (ATKINSON; VAN RIPER, 1991; VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008).

Surtos de malária aviária são um problema recorrente em pinguins mantidos em zoológicos, aquários e centros de reabilitação no Brasil e em todo o mundo (RODHAIN, 1939; GRINER; SHERIDAN, 1967; BAK et al., 1984; PENRITH et al., 1994; BUENO et al., 2010). Em natureza, a infecção plasmódica foi identificada em pinguins no Arquipélago de Galápagos, Ilha Gough, África do Sul e Nova Zelândia (FANTHAM; PORTER, 1944; LAIRD, 1950; LEVIN et al., 2009). Embora tenha sido registrada em centros de reabilitação na Argentina e no Chile (CARVAJAL; ALVARADO, 2009; CAPELLINO et al., 2013), não está claro se a infecção plasmódica ocorre em pinguins-de-Magalhães em natureza (JOVANI et al., 2001; QUILLFELDT et al., 2010). Assim, quando esta doença é registrada em pinguins em reabilitação no litoral brasileiro (RUOPPOLO et al., 2004b; MEIRELLES-LEITE et al., 2008; BALDASSIN et al., 2013), não se sabe se a infecção é resultante da exposição a mosquitos no curto período de cativeiro, ou se os animais já adentram ao centro de reabilitação infectados.

Considerando as lacunas de conhecimento sobre a malária aviária em pinguins na América do Sul e a particular relevância desta enfermidade para a medicina e a conservação destas aves, a presente tese se propõe a investigar e discutir aspectos epidemiológicos e patológicos da malária aviária em pinguins, em especial no contexto dos centros de reabilitação brasileiros.

1.1 APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS

Esta tese está organizada em oito capítulos, incluindo este capítulo introdutório. Os capítulos 3 a 7 estão redigidos e formatados de forma compatível com a publicação científica, sendo que os capítulos 4 a 7 estão em língua inglesa para publicação em revistas científicas internacionais.

O Capítulo 2 apresenta uma breve revisão de literatura acerca da biologia e ecologia de pinguins, com ênfase no pinguim-de-Magalhães. O objetivo não é oferecer uma revisão completa do atual estado de conhecimento, mas sim uma abordagem panorâmica das características biológicas e ecológicas destas aves que serão pertinentes para a interpretação dos capítulos subsequentes.

O Capítulo 3 faz uma revisão geral da parasitologia, epidemiologia e clínica das hemosporidioses aviárias. O texto objetiva uma abordagem direta e prática, voltada à consulta de médicos veterinários atuando no cuidado clínico de aves em cativeiro ou em reabilitação no Brasil, com ênfase especial em pinguins. Este capítulo foi submetido para publicação, com coautoria da Dra. Nola J. Parsons, na forma de um capítulo da segunda edição do livro “Tratado de animais selvagens – medicina veterinária”, editado por Zalmir Silvino Cubas, Silva, Jean Carlos Ramos Silva e José Luiz Catão-Dias.

O Capítulo 4 apresenta uma compilação, revisão e meta-análise dos parasitas intracelulares encontrados no sangue de pinguins, com a discussão crítica da validade dos registros publicados na literatura, da distribuição geográfica destes parasitas, das necessidades e prioridades para estudos futuros e das implicações para a conservação destas aves. Este capítulo foi preparado com a perspectiva de submissão na forma de uma revisão de literatura em duas partes, a serem encaminhadas às revistas científicas *Polar Biology* e *Journal of Wildlife Diseases* com coautoria do Prof. José Luiz Catão-Dias.

O Capítulo 5 investiga um surto de malária aviária em pinguins-de-Magalhães em um centro de reabilitação no sul do Brasil, combinando abordagens clínicas, hematológicas, biomoleculares e histopatológicas para investigar a epidemiologia e patologia da infecção por *Plasmodium* spp. em pinguins durante um surto de elevada

morbidade e mortalidade. Este capítulo é apresentado no formato final no qual foi aceito para publicação pela revista científica *PLOS One*, com co-autoria de Cristiane K. M. Kolesnikovas, Sandro Sandri, Patrícia Silveira, Nayara O. Belo, Francisco C. Ferreira Junior, Sabrina Epiphany, Mário Steindel, Érika M. Braga e José Luiz Catão-Dias.

O Capítulo 6 apresenta um amplo estudo da ocorrência da malária aviária e outras hemoparasitoses em pinguins-de-Magalhães em reabilitação em diversas instituições ao longo da costa brasileira, buscando trazer uma nova compreensão sobre a epidemiologia e patologia desta enfermidade e das suas consequências para a reabilitação destas aves no país. Este capítulo foi preparado com a perspectiva de submissão à revista científica *Emerging Infectious Diseases*, com coautoria de Rodolfo Pinho da Silva-Filho, Cristiane K. M. Kolesnikovas, Luis Felipe S. P. Mayorga, Valeria Ruoppolo, Sabrina Epiphany, Marcos Amaku, Érika M. Braga e José Luiz Catão-Dias.

O Capítulo 7 relata a investigação de hemoparasitas em pinguins em ilhas subantárticas do Arquipélago South Shetlands, próximo à Península Antártica, além de apresentar resultados hematológicos e de ectoparasitas. Este capítulo é apresentado no formato final no qual foi aceito para publicação pela revista científica *Polar Biology*, com coautoria de Flavia R. Miranda, Valeria Ruoppolo, Ana Olívia de Almeida Reis, Erli Schneider Costa, Adriana Rodrigues de Lira Pessoa, João Paulo Machado Torres, Larissa Schmauder Teixeira da Cunha, Roberta da Cruz Piuco, Victor Hugo Valiati, Daniel González-Acuña, Marcelo B. Labruna, Maria Virginia Petry, Sabrina Epiphany e José Luiz Catão-Dias.

O Capítulo 8 encerra esta tese com uma breve discussão das conclusões que resultam dos estudos apresentados nos capítulos anteriores, além de agregar os apêndices relevantes para uma interpretação mais aprofundada dos métodos e resultados laboratoriais.

REFERÊNCIAS

AINLEY, D. G. Biomass of birds and mammals in the Ross Sea. In: SIEGFRIED, W.; CONDY, P. R.; LAWS, R. M. **Antarctic nutrient cycles and food webs**. Heidelberg: Springer, 1985. p. 498-515.

ATKINSON, C. T.; LAPOINTE, D. A. Introduced avian diseases, climate change, and the future of Hawaiian Honeycreepers. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, n. 1, p. 53-63, 2009.

ATKINSON, C. T. Avian Malaria. In: ATKINSON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. **Parasitic diseases of wild birds**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. p. 35-53.

BAK, Ung-Bok; PARK, Jae-Chan; LIM, Young-Jae. An outbreak of malaria in penguins at the Farm-land Zoo. **Korean Journal of Parasitology**, v. 22, n. 2, p. 267-272, 1984.

BALDASSIN, P.; WERNECK, M. R.; TORRES, F.; CAMPOS, S. E.; ALMOSNY, N. Hemoparasite (*Plasmodium* spp.) in *Spheniscus magellanicus*, a case report. In: INTERNATIONAL PENGUIN CONFERENCE, 8; 2013, Bristol. **Proceedings...** Bristol: IPC, 2013. p. 72.

BOERSMA, P. D. Penguins as marine sentinels. **BioScience**, v. 58, n. 7, p. 597-607, 2008.

BRANDÃO, M. L.; BRAGA, K. M.; LUQUE, J. L. Marine debris ingestion by Magellanic penguins, *Spheniscus magellanicus* (Aves: Sphenisciformes), from the Brazilian coastal zone. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 2246-2249, 2011.

BUENO, M. G.; LOPEZ, R. P. G.; MENEZES, R. M. T.; COSTA-NASCIMENTO, M. J.; LIMA, G. F. M. C.; ARAÚJO, R. A. S.; GUIDA, F. J. V.; KIRCHGATTER, K. Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo Zoo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1-2, p. 123-127, 2010.

CAPELLINO, F.; VANSTREELS, R. E. T.; RODRÍGUEZ-HEREDIA, S. A.; LOUREIRO, J.; CATÃO-DIAS, J. L. Avian malaria (*Plasmodium* sp) in Magellanic Penguins at Fundación Mundo Marino (San Clemente del Tuyú, Argentina). In: INTERNATIONAL PENGUIN CONFERENCE, 8; 2013, Bristol. **Proceedings...** Bristol: IPC, 2013. p. 161.

CARVAJAL, E. R.; ALVARADO, P. M. Pesquisa de *Plasmodium* spp. en pingüinos de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) de la Región de los Ríos: Malaria aviar como nueva patología de interés en la avifauna local. **Boletín Veterinario Oficial**, v. 10, p. 1-4, 2009.

CEMAVE. CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE AVES SILVESTRES. **Projeto Nacional de Monitoramento do Pinguim-de-Magalhães *Spheniscus magellanicus***. Cabedelo: CEMAVE, 2011. 34 p.

CLARKE, J. R.; KERRY, K. R. Diseases and parasites of penguins. **Korean Journal of Polar Research**, v. 4, n. 2, p. 79-96, 1993.

COOPER, J.; WOEHLER, E. J. Consumption of Antarctic krill (*Euphasia superba*) by seabirds during summer in the Prydz Bay region, Antarctica. In: EL-SAYED, S. Z. **Southern Ocean Ecology: the BIOMASS perspective**. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. p. 247-260.

ESTES, J. A. Concerns about rehabilitation of oiled wildlife. **Conservation Biology**, v. 12, n. 5, p. 1156-1157, 1998.

FANTHAM, H. B.; PORTER, A. On a *Plasmodium* (*Plasmodium relictum* var. *spheniscidae*, n. var.), observed in four species of penguins. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 114, p. 279-292, 1944.

GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D.; RUOPPOLO, V.; REYES, L.; REBSTOCK, G. A.; GRIOT, K.; HEREDIA, S. R.; ADORNES, A. C.; SILVA-FILHO, R. P. Chronic oil pollution harms Magellanic penguins in the Southwest Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 193-198, 2006.

GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D.; RUOPPOLO, V.; SILVA-FILHO, R. P.; ADORNES, A. C.; SENA, D. C.; VELOZO, R.; KOLESNIKOVAS, C. M.; DUTRA, G.; MARACINI, P.; NASCIMENTO, C. C.; RAMOS-JÚNIOR, V.; BARBOSA, L.; SERRA, S. Magellanic penguin mortality in 2008 along the SW Atlantic coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 10, p. 1652-1657, 2010.

GRINER, L. A.; SHERIDAN, B. W. Malaria (*Plasmodium relictum*) in penguins at the San Diego Zoo. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 1, p. 7-17, 1967.

HEREDIA, S. A. R.; ALVAREZ, C. K.; LOUREIRO, J. **Aves marinas empetroladas: Guía para su manejo y atención.** San Clemente del Tuyú: Fundación Mundo Marino, 2008. 138 p.

JONES, H. I.; SHELLAM, G. R. Blood parasites in penguins, and their potential impact on conservation. **Marine Ornithology**, v. 27, p. 181-184, 1999.

JOVANI, R.; TELLA, J. L.; FORERO, M. G.; BERTELLOTTI, M.; BLANCO, G.; CEBALLOS, O.; DONÁZAR, J. A. Apparent absence of blood parasites in the Patagonian seabird community: is it related to the marine environment? **Waterbirds**, v. 24, n. 3, p. 430-433, 2001.

LAIRD, M. Some blood parasites of New Zealand. **Zoological Publications of Victoria University College**, v. 5, p. 1-20, 1950.

LEVIN, I. I.; PARKER, P. G. Hemosporidian parasites: impacts on avian hosts. In: MILLER, E.; FOWLER, M. **Fowler's zoo and wild animals medicine.** Missouri: Elsevier Saunders, 2011. p. 356-363.

LEVIN, I. I.; OUTLAW, D. C.; VARGAS, F. H.; PARKER, P. G. *Plasmodium* blood parasite found in endangered Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). **Biological Conservation**, v. 142, p. 3191-3195, 2009.

MEIRELLES-LEITE, A. T.; XAVIER, M. O.; CABANA, A. L.; SILVA-FILHO, R. P. Principais doenças infecciosas em pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) em centro de reabilitação. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE REHABILITACIÓN DE FAUNA MARINA, 1; 2008, San Clemente del Tuyú. **Proceedings...** San Clemente del Tuyú: CLARFM, 2008. p. 71-72.

PENRITH, M. L.; HUCHZERMEYER, F. W.; WET, S. C.; PENRITH, M. J. Concurrent infection with *Clostridium* and *Plasmodium* in a captive king penguin *Aptenodytes patagonicus*. **Avian Pathology**, v. 23, n. 2, p. 373-380, 1994.

QUILLFELDT, P.; MARTÍNEZ, J.; HENNICKE, J.; LUDYNIA, K.; GLADBACH, A.; MASELLO, J. F.; RIOU, S.; MERINO, S. Hemosporidian blood parasites in seabirds: a comparative genetic study from Antarctic to tropical habitats. **Naturwissenschaften**, v. 97, p. 809-817, 2010.

RODHAIN, J. L'infection a *Plasmodium relictum* chez les pingouins. **Annales de Parasitologie**, v. 17, n. 2, p. 139-157, 1939.

RUOPPOLO, V.; ADORNES, A. C.; NASCIMENTO, A. C.; SILVA-FILHO, R. P. Reabilitação de pinguins afetados por petróleo. **Clínica Veterinária**, v. 9, n. 51, p. 78-83, 2004a.

RUOPPOLO, V.; SILVA-FILHO, R. P.; ADORNES, A. C.; CATÃO-DIAS, J. L. Occurrence of Malaria in Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in a rehabilitation center in Southern Brazil. In: INTERNATIONAL PENGUIN CONFERENCE, 5; 2004, Ushuaia. **Proceedings...** Ushuaya: IPC, 2004b.

SILVA-FILHO, R. P.; RUOPPOLO, V. Sphenisciformes. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens** – medicina veterinária. São Paulo: Roca, 2007. p. 309-323.

STOKES, D. L.; BOERSMA, P. D.; CASENAVE, J. L.; GARCÍA-BORBOROGLU, P. Conservation of migratory Magellanic penguins requires marine zoning. **Biological Conservation**, v. 170, p. 151-161, 2014.

TOURINHO, P. S.; SUL, J. A. I.; FILLMANN, G. Is marine debris ingestion still a problem for the coastal marine biota of southern Brazil? **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 396-401, 2010.

VALKIŪNAS, G. **Avian malaria parasites and other haemosporidia**. Boca Ratón: CRC Press, 2005. 932 p.

2 CONSIDERAÇÕES ACERCA DA BIOLOGIA E ECOLOGIA DOS PINGUINS

2.1 INTRODUÇÃO

É certo que, muito antes do desenvolvimento da escrita, os pinguins já eram conhecidos por populações nativas da América do Sul, África e Oceania (MÜLLER-SCHWARZE, 1984; KLOKLER et al., 2010). O primeiro relato documentado sobre estas aves aparece nos registros da primeira expedição do português Vasco da Gama, na primavera de 1498, em que é descrita a observação de “aves grandes como patos, que não voam por não terem penas nas asas, e que zurram como asnos” no sul do continente africano, referindo-se a pinguins-africanos (*Spheniscus demersus*) (KOPKE; PAIVA, 1838). A primeira descrição científica de espécies de pinguins seria feita pelo sueco Carolus Linnaeus em 1758 na décima edição do “Systema Naturae”, que classificou o pinguim-africano no mesmo gênero que os albatrozes gigantes (Aves: Procellariiformes), nomeando-o *Diomedea demersa*, e agrupou o pinguim-de-penacho-amarelo-do-norte (*Eudyptes moseleyi*) aos rabos-de-palha (Aves: Phaethontiformes), dando-lhe o nome de *Phaethon demersus* (LINNAEUS, 1758).

Os pinguins são os únicos representantes da ordem Sphenisciformes, sendo atualmente classificados em 18 espécies, das quais 13 são consideradas ameaçadas de extinção em algum grau (Figura 2.1, Quadro 2.1) (GARCÍA-BORBOROGLU; BOERSMA, 2013; IUCN, 2014). Filogeneticamente, os pinguins são mais próximos dos Procellariiformes, a ordem que compreende os petréis, albatrozes, fulmares, pardelas e painhos, e acredita-se que tenham evoluído a partir de pequenas aves voadoras capazes de nado e mergulho (SIMPSON, 1946; HACKETT et al., 2008; KSEPKA; CLARKE, 2010).

Figura 2.1 - Ilustrações, nomes populares e científicos das espécies de pinguins

Fonte: Ilustração de Barbara Harmon, adaptação de Vanstreels (2014)

Quadro 2.1 - Distribuição geográfica, população estimada, tendência demográfica e estado de conservação das espécies de pinguins

Espécie	Distribuição geográfica das colônias reprodutivas	População estimada (número de casais)	Tendência demográfica	Estado de conservação
<i>Aptenodytes forsteri</i>	Antártida (continente e península)	238.000	Incerta	Menor preocupação
<i>Aptenodytes patagonicus</i>	Amsterdã, Crozet, Falklands/Malvinas, Heard, Kerguelen, Marion, McDonald, Prince Edward, Saint Paul, South Georgia, South Sandwich, South Shetland	> 1.000.000	Aumento	Menor preocupação
<i>Pygoscelis papua</i>	Antártida (península), Crozet, Falklands/Malvinas, Heard, Kerguelen, Marion, Macquarie, McDonald, South Georgia, South Orkney, South Sandwich, South Shetland	387.000	Aumento	Quase ameaçada
<i>Pygoscelis antarcticus</i>	Antártica (península), Balleny, Bouvet, Scott, South Georgia, South Sandwich, South Shetland, Thurston	7.500.000	Declínio	Menor preocupação
<i>Pygoscelis adeliae</i>	Antártida (continente e península), Balleny, Bouvet, Scott, South Sandwich, South Shetland, Thurston	4.000.000 – 5.000.000	Estável	Menor preocupação
<i>Megadyptes antipodes</i>	Antipodes, Auckland, Bounty, Campbell, Nova Zelândia Sul	1.700	Incerta	Ameaçada
<i>Eudyptes schlegeli</i>	Macquarie	1.700.000	Declínio	Vulnerável
<i>Eudyptes chrysolophus</i>	Antártica (península), Bouvet, Chile, Crozet, Falklands/Malvinas, Heard, Kerguelen, Marion, McDonald, Prince Edward, South Georgia, South Orkney, South Sandwich	17.000.000	Declínio	Vulnerável
<i>Eudyptes sclateri</i>	Antipodes, Bounty, Campbell	81.000	Declínio	Ameaçada
<i>Eudyptes robustus</i>	Snares	24.000 – 29.000	Estável	Vulnerável
<i>Eudyptes pachyrhynchus</i>	Nova Zelândia Sul	2.500 – 3.000	Incerta	Vulnerável
<i>Eudyptes moseleyi</i>	Amsterdã, Gough, Saint Paul, Tristan da Cunha	190.000 – 230.000	Declínio	Ameaçada
<i>Eudyptes chrysocome</i>	Argentina, Antipodes, Auckland, Bounty, Campbell, Chile, Crozet, Falklands/Malvinas, Heard, Macquarie, Marion, McDonald, Prince Edward, Snares	1.230.000	Declínio	Vulnerável
<i>Spheniscus magellanicus</i>	Argentina, Chile, Falklands/Malvinas	1.000.000 – 1.300.000	Incerta	Quase ameaçada
<i>Spheniscus demersus</i>	África do Sul, Namíbia	25.000	Declínio	Ameaçada
<i>Spheniscus humboldti</i>	Chile, Peru	24.000	Declínio	Vulnerável
<i>Spheniscus mendiculus</i>	Galápagos	1.800	Declínio	Ameaçada
<i>Eudyptula minor</i>	Austrália, Chatham, Nova Zelândia Norte, Nova Zelândia Sul	600.000	Incerta	Menor preocupação

Fonte: Williams (1995), Ksepka et al. (2006), Fretwell et al. (2012), García-Borboroglu e Boersma (2013) e IUCN (2014), adaptação de Vanstreels (2014)

As ameaças mais importantes à conservação destas aves são a depleção de suas presas devido à sobrepesca, a contaminação dos oceanos por derivados do petróleo e a perturbação ou destruição de seus habitats reprodutivos. Adicionalmente, a captura incidental em redes de pesca, as colisões com embarcações, a poluição marinha, as algas produtoras de biotoxinas, as enfermidades infecciosas, a caça predatória e numerosos outros fatores também ameaçam estas aves (BOERSMA; STOKES, 1995; GARCÍA-BORBOROGLU; BOERSMA, 2013).

2.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Os pinguins distribuem-se exclusivamente no Hemisfério Sul, com colônias reprodutivas no continente antártico, em ilhas subantárticas, na América do Sul, África, Austrália e Nova Zelândia (Quadro 2.1 e Figura 2.2). Ao contrário da percepção pública mais comum, apenas duas espécies podem ser consideradas verdadeiramente antárticas: o pinguim-imperador (*Aptenodytes forsteri*) e o pinguim-de-Adélia (*Pygoscelis adeliae*). A ampla maioria dos pinguins está distribuída em ambientes temperados ou subantárticos, e inclusive há espécies que habitam ambientes tropicais como os pinguim-de-Galápagos (*Spheniscus mendiculus*) e o pinguim-de-Humboldt (*Spheniscus humboldti*) (WILLIAMS, 1995; ANCEL et al., 2013; GARCÍA-BORBOROGLU; BOERSMA, 2013).

Embora tenham o comportamento de agrupar-se durante a estação reprodutiva, nem todas as espécies de pinguins permanecem na proximidade de suas colônias reprodutivas durante o restante do ano. Há espécies sedentárias, que permanecem nas colônias reprodutivas durante todo o ano, como os pinguins-azuis (*Eudyptula minor*) ou os pinguins-africanos; espécies migratórias, que retornam às colônias apenas no período reprodutivo e permanecem o restante do ano no ambiente marinho, como os pinguins-de-Magalhães; e espécies semi-migratórias, que permanecem nas colônias por períodos irregulares, como os pinguins-rei (*Aptenodytes patagonicus*) (CLAUSEN; PÜTZ, 2003; PÜTZ et al., 2007; GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2013).

Durante as incursões ao mar para a alimentação ou invernada os pinguins podem percorrer centenas a milhares de quilômetros em mar aberto, vagando em função da disponibilidade de presas, e muitas vezes concentrando-se em áreas de convergência, divergência ou ressurgência de correntes marinhas, como as convergências subtropical e subantártica e a divergência polar (CLAUSEN; PÜTZ, 2003; PÜTZ et al., 2000, 2006, 2007; WILSON et al., 2005; BOERSMA et al., 2009).

Figura 2.2 - Distribuição geográfica das colônias reprodutivas de pinguins

Fonte: Williams (1995), IUCN (2014), DSEWPC (2012), Fretwell et al. (2012) e García-Borboroglu e Boersma (2013), adaptação de Vanstreels (2014)

2.3 CICLO DE VIDA

Muitas espécies de pinguins seguem um ciclo de vida anual bem definido, sobretudo aquelas habitantes de regiões subantárticas e antárticas, podendo ser subdividido em seis etapas (Figuras 2.3 e 2.4): assentamento, incubação, guarda, creche e emancipação, muda de plumagem e migração invernal (WILLIAMS, 1995; GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2013).

Na etapa de assentamento, que para o pinguim-de-Magalhães inicia-se em meados de setembro, os adultos em idade reprodutiva chegam às colônias reprodutivas; os machos chegam às colônias entre uma a duas semanas antes das fêmeas, disputando e estabelecendo-se nos ninhos (BOERSMA et al., 1990, 2013). Os pinguins são popularmente conhecidos por serem fiéis aos seus parceiros, sendo que na maioria das espécies um casal bem sucedido na temporada reprodutiva anterior tem 70-95% de chance de parrear novamente, utilizando o ninho do ano anterior como um ponto de encontro (DAVIS, 1988; WILLIAMS, 1996; DOBSON; JOUVENTIN, 2003).

Figura 2.3 - Diagrama do ciclo anual de vida do pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*)

Fonte: Boersma et al. (2013), adaptação de Vanstreels (2014)

Após um breve período de corte e cópula ocorrerá a oviposição, dando início à etapa de incubação. Pinguins produzem dois ovos por temporada reprodutiva, com a exceção dos pinguins-imperadores e reis em que um único ovo é posto por temporada. A incubação dos ovos é feita em turnos alternados, sendo 3 a 6 turnos com duração de 5-15 dias cada, em que um dos pais permanece no ninho incubando os ovos enquanto o outro vai ao mar para alimentar-se; a exceção são os pinguins-imperadores, nos quais não há turnos de incubação e esta é feita inteiramente pelo macho (WILLIAMS, 1995; CHIARADIA; KERRY, 1999; NUMATA et al., 2000).

A etapa de guarda dos filhotes inicia-se a partir da eclosão dos ovos, e neste período os filhotes são funcionalmente ectotérmicos, dependendo de seus pais para manterem-se aquecidos e também para a proteção contra eventuais predadores. Durante a guarda, macho e fêmea se alternarão em turnos de 2-4 dias para permanecer no ninho protegendo os filhotes ou se alimentar no mar (TAYLOR, 1986; CHIARADIA; KERRY, 1999; NUMATA et al., 2000; DUCHAMP et al., 2002).

Com o crescimento dos filhotes e a aquisição da efetiva capacidade de termorregulação, os filhotes se tornarão capazes de sobreviver por períodos curtos sem os pais, iniciando-se a etapa de creche. Nessa etapa, os pais partem ao mar em excursões cada vez mais longas, retornando para regurgitar alimento aos filhotes periodicamente. Finalmente, quando os filhotes adquirem a plumagem juvenil impermeável, os pais não retornam mais para alimentá-los e os filhotes buscam o mar para se alimentarem sozinhos (PETTINGILL, 1960; WILLIAMS, 1995).

Após a reprodução, os pinguins adultos prosseguem à muda pós-nupcial, isto é, a completa troca de sua plumagem por uma inteiramente nova. Este é um processo desgastante, pois além do grande consumo energético necessário para a troca da plumagem por duas a quatro semanas, durante todo o processo os pinguins serão incapazes de nadar, passando por um jejum prolongado (WILLIAMS et al., 1989; GAUTHIER-CLERC et al., 2002; WIENECKE et al., 2004; BOURGEON et al., 2007).

Concluída a muda de plumagem, os pinguins terão uma plumagem renovada e plenamente impermeável e poderão retornar ao mar, iniciando a etapa de migração invernal. Durante este período, os pinguins buscarão alimentar-se para repor e acumular reservas corporais de gordura com o objetivo final de maximizar sua

reprodução na temporada reprodutiva subsequente (WILLIAMS et al., 1989; CHEREL; FREBY, 1994; GAUTHIER-CLERC et al., 2002; WILSON et al., 2005).

Figura 2.4 - Fases do ciclo anual de vida do pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*)

Fonte: (a) Michel Gunther / Biosphoto, (b) Mike Bingham, (c) David Hosking / Frank Lane Picture Agency, (d) Daniel Gomez / SplashdownDirect.com, (e) Valeria Ruoppolo / IFAW, (f) Michael Booth / IFAW

Legenda: (a) assentamento e cópula, (b) incubação, (c) guarda, (d) creche, (e) muda de plumagem, (f) migração invernal

2.4 OCORRÊNCIA NO BRASIL

Embora nenhuma espécie de pinguim reproduza-se na costa brasileira, quatro espécies de pinguins têm ocorrência registrada em território brasileiro: pinguim-de-Magalhães, pinguim-de-penacho-amarelo-do-sul (*Eudyptes chrysocome*), pinguim-rei e pinguim-Macaroni (*Eudyptes chrysolophus*). Enquanto as demais espécies são apenas registradas esporadicamente, os pinguins-de-Magalhães estão presentes na costa brasileira às centenas ou milhares todos os anos (SICK, 2001; BARQUETE et al., 2006; CBRO, 2011). Assim como ocorre para as demais espécies de pinguins, a distribuição geográfica dos pinguins-de-Magalhães está intimamente relacionada à disponibilidade de suas presas. No caso das populações de pinguins-de-Magalhães residentes na costa atlântica da América do Sul, a distribuição está determinada, sobretudo, pela elevada produtividade biológica da convergência Brasil-Malvinas (WILSON et al., 2005; FALABELLA et al., 2009).

A convergência Brasil-Malvinas corresponde ao encontro das águas frias da Corrente das Malvinas com as águas quentes da Corrente do Brasil. As águas frias da Corrente das Malvinas são ricas em nutrientes e, ao se encontrarem com as águas quentes da Corrente do Brasil, produzem uma combinação de temperaturas e nutrientes que resulta em um ambiente extremamente favorável para o acelerado crescimento do fitoplâncton (Figura 2.5) (FALABELLA et al., 2009). Outros fatores que contribuem à elevada produtividade biológica nesta região são o influxo de águas doces provenientes de rios e lagoas (sobretudo do Rio da Prata) e a forte pluviosidade costeira (GORDON, 1989; CIOTTI et al., 1995; PIOLA; MATANO, 2001).

A partir desta elevada produção biológica primária, resulta uma rica teia alimentar sobre a qual numerosas espécies de peixes, crustáceos e moluscos se nutrem e dos quais, por sua vez, os pinguins-de-Magalhães se alimentarão. A Figura 2.6 representa a distribuição geográfica das colônias reprodutivas e áreas de alimentação dos pinguins-de-Magalhães, evidenciando a sobreposição de suas áreas de reprodução e alimentação com as áreas de alta produtividade primária da Convergência Brasil-Malvinas.

Figura 2.5 - Características oceanográficas do mar Patagônico

Fonte: Falabella et al. (2009), adaptação de Vanstreels (2014)

Legenda: (a) representação esquemática das correntes marinhas, (b) temperatura de superfície do mar, (c) concentração de nitratos, (d) produtividade primária durante a primavera (clorofila- α)

Durante a fase invernal os pinguins-de-Magalhães acompanham o contorno da plataforma continental, mantendo-se a aproximadamente entre 50 e 200 km da costa, tipicamente em grupos de 10 a 30 animais (WILLIAMS; BOERSMA, 1995; PÜTZ et al., 2000, 2007). Em circunstâncias normais, os pinguins-de-Magalhães permanecerão em

alto mar durante todo o período de internada, retornando à terra apenas ao regressar às áreas de reprodução. No entanto, o encontro de pinguins em praias brasileiras ocorre com frequência e é conhecido como um fenômeno natural, com o aparecimento anual de centenas a milhares de animais, principalmente no inverno e primavera (VOOREN; BRUSQUE, 1999; SICK, 2001; PETRY; FONSECA, 2002; MÄDER et al., 2010; SCHERER et al., 2011).

Os fatores que levam ao encalhe – e muitas vezes mortalidade – destas aves na costa atlântica da América do Sul todavia não estão esclarecidos, e há razões para considerar que este processo natural esteja sendo amplificado pelos impactos humanos no ambiente marinho (GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2006, 2010; CEMAVE, 2011).

Figura 2.6 - Distribuição geográfica das áreas de reprodução e alimentação do pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*)

Fonte: Boersma et al. (2013) e Stokes et al. (2014),
adaptação de Vanstreels (2014)

Alguns fatores que levam ao encalhe são bastante evidentes e de fácil detecção, tais como a poluição marinha crônica por petróleo e seus derivados (GANDINI et al., 1994; RUOPPOLO et al., 2004a; GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2006, 2010; SCHERER et al., 2011), a ingestão de itens antrópicos, como fragmentos de plástico, nylon, metais, entre outros (PETRY; FONSECA, 2002; PINTO et al., 2006; TOURINHO et al., 2010; VEGA et al., 2010; BRANDÃO et al., 2011) e a captura incidental em redes de pesca (GANDINI et al., 1999; TAMINI et al., 2002; CARDOSO et al., 2010).

Outros fatores, no entanto, podem ser muito mais insidiosos e de difícil demonstração, como a poluição marinha por pesticidas e metais pesados (KEYMER et al., 2001; VEGA et al., 2010; BALDASSIN et al., 2012), a proliferação atípica de algas ou moluscos produtores de biotoxinas (UHART et al., 2004), a intensa infecção por parasitas gastrointestinais (PINTO et al., 2006; GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2010; BRANDÃO et al., 2013), uma menor aptidão e inexperiência juvenil durante a sua primeira migração invernal (PETRY; FONSECA, 2002; PINTO et al., 2006; MÄDER et al., 2010; BRANDÃO et al., 2011; SCHERER et al., 2011), uma menor eficiência das fêmeas na busca por alimento em condições de baixa disponibilidade de presas (VANSTREELS et al., 2013), o consumo de itens alimentares atípicos e/ou de baixo valor nutricional (FONSECA et al., 2001; PINTO et al., 2006; BALDASSIN et al., 2010) e as flutuações atípicas de disponibilidade de presas devido à Oscilação Sul El Niño e/ou às mudanças climáticas (GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2010; MÄDER et al., 2010; SCHERER et al., 2011).

Independentemente das causas e fatores que podem levar estes pinguins ao encalhe em praias brasileiras, uruguaias e argentinas, várias instituições têm buscado recolher estas aves e reabilitá-las para o posterior retorno à natureza (RUOPPOLO et al., 2004a, 2012; GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2006, 2010; HEREDIA et al., 2008). Estas estratégias de reabilitação podem ser valiosas ferramentas para mitigar os impactos negativos das atividades humanas, minimizando os efeitos negativos destas sobre a conservação dos pinguins e do ambiente marinho (GIESE et al., 2000; GOLDSWORTHY et al., 2000; RUOPPOLO et al., 2004a, 2012; WOLFAARDT et al., 2009).

2.5 ENFERMIDADES RELEVANTES PARA A CONSERVAÇÃO

Há numerosos patógenos e enfermidades que podem constituir ameaças relevantes à conservação dos pinguins, além de prejudicar os esforços de reabilitação destas aves (CLARKE; KERRY, 1993; DUIGNAN, 2001; KERRY; RIDDLE, 2009). Dentre as enfermidades de etiologia infecciosa, destacam-se a malária aviária (JONES; SHELLAM, 1999a) e outras hemoparasitoses (HILL et al., 2010; YABSLEY et al., 2012), além da aspergilose (OBENDORF; McCOLL, 1980; XAVIER et al., 2007), pasteurelose (LISLE et al., 1990), poxvirose aviária (KANE et al., 2012; NIEMEYER et al., 2013), herpesvíroses aviárias (KINCAID et al., 1988) e clamidiose (JENCEK et al., 2012). Além disto, a causa de muitas enfermidades que acometem os pinguins ainda não está esclarecida, como é o caso da doença da perda das penas (*Penguin feather loss disorder*) (KANE et al., 2010), da estomatite diftérica (ALLEY et al., 2004, 2005), e de vários episódios de mortalidade em massa em natureza (HOCKEN, 2000, 2005; KEYMER et al., 2001; BARBOSA; PALACIOS, 2009; KERRY; RIDDLE, 2009).

A malária aviária se sobressai dentre as enfermidades infecciosas por seu histórico comprovado em afetar negativamente a conservação de aves que não co-evoluíram com o parasita, como demonstrado por seus impactos dramáticos sobre a conservação das aves nativas do Arquipélago do Havaí (VAN RIPER III et al., 1986; ATKINSON; LAPOINTE, 2009). Os pinguins são notoriamente suscetíveis a esta enfermidade, e desenvolvem rápida e elevada mortalidade quando expostos à infecção por *Plasmodium* sp em cativeiro (GRINER; SHERIDAN, 1967; STOSKOPF; BEIER, 1979; FIX et al., 1988), e a presença deste patógeno em pinguins de vida livre também traz grande preocupação acerca do seu potencial de causar surtos de mortalidade com efeitos significativos para a conservação (BROSSY et al., 1999; JONES; SHELLAM, 1999b; MILLER et al., 2001; LEVIN et al., 2009).

REFERÊNCIAS

- ALLEY, M. R.; MORGAN, K. J.; GILL, J. M.; HOCKEN, A. G. Diseases and causes of mortality in yellow-eyed penguins, *Megadyptes antipodes*. **Kokako**, v. 11, n. 2, p. 18-23, 2004.
- ALLEY, M. R.; GARTRELL, B. D.; MORGAN, K. J. Severe outbreak of diphtheritic stomatitis in yellow-eyed penguins, *Megadyptes antipodes*. **Kokako**, v. 12, n. 1, p. 16, 2005.
- ANCEL, A.; BEAULIEU, M.; GILBERT, C. The different breeding strategies of penguins: a review. **Comptes Rendus Biologies**, v. 336, p. 1-12, 2013.
- ATKINSON, C. T.; LAPOINTE, D. A. Introduced avian diseases, climate change, and the future of Hawaiian Honeycreepers. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, n. 1, p. 53-63, 2009.
- BALDASSIN, P.; SANTOS, R. A.; CUNHA, J. M. M.; WERNECK, M. R.; GALLO, H. Cephalopods in the diet of Magellanic penguins *Spheniscus magellanicus* found on the coast of Brazil. **Marine Ornithology**, v. 38, p. 55-57, 2010.
- BALDASSIN, P.; TANIGUCHI, S.; GALLO, H.; SILVA, R. J.; MONTONE, R. C. Persistent organic pollutants in juvenile Magellan penguins (*Spheniscus magellanicus*) found on the northern shore of the state of São Paulo and southern shore of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 2502-2506, 2012.
- BARBOSA, A.; PALACIOS, M. J. Health of Antarctic birds: a review of their parasites, pathogens and diseases. **Polar Biology**, v. 32, p. 1095-1115, 2009.
- BARQUETE, V.; BUGONI, L.; SILVA-FILHO, R. P.; ADORNES, A. C. Review of records and notes on king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) and rockhopper penguin (*Eudyptes chrysocome*) in Brazil. **Hornero**, v. 21, p. 45-48, 2006.
- BOERSMA, P. D.; STOKES, D. L.; YORIO, P. M. Reproductive variability and historical change of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) at Punta Tombo, Argentina. In: DAVIS, L. S.; DARBY, J. T. **Penguin Biology**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 15-43.

BOERSMA, P. D.; REBSTOCK, G. A.; FRERE, E.; MOORE, S. Following the fish: penguins and productivity in the South Atlantic. **Ecological Monographs**, v. 79, n. 1, p. 59-76, 2009.

BOURGEON, S.; VIERA, V. M.; RACLOT, T.; GROSCOLAS, R. Hormones and immunoglobulin levels in king penguins during moulting and breeding fasts. **Ecoscience**, v. 14, n. 4, p. 519-528, 2007.

BRANDÃO, M. L.; BRAGA, K. M.; LUQUE, J. L. Marine debris ingestion by Magellanic penguins, *Spheniscus magellanicus* (Aves: Sphenisciformes), from the Brazilian coastal zone. **Systematic Parasitology**, v. 85, n. 1, p. 79-98, 2013.

BRANDÃO, M. L.; LUQUE, J. L.; SCHOLZ, T.; KOSTADINOVA, J. L. New records and descriptions of digeneans from the Magellanic penguins *Spheniscus magellanicus* (Forster) (Aves: Sphenisciformes) on the coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 2246-2249, 2011.

BOERSMA, P. D.; FRERE, E.; KANE, O.; POZZI, L. M.; PÜTZ, K.; RAYA-REY, A.; REBSTOCK, G. A.; SIMEONE, A.; SMITH, J.; VAN BUREN, A.; YORIO, P.; GARCÍA-BORBOROGLU, P. Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). In: GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D. **Penguins: natural history and conservation**. Seattle: Washington University Press, 2013. p. 145-152.

BROSSY, J. J.; PLÖS, A. L.; BLACKBEARD, J. M.; KLINE, A. Diseases acquired by captive penguins: what happens when they are released into the wild? **Marine Ornithology**, v. 27, p. 185-186, 1999.

CARDOSO, L. G.; BUGONI, L.; MANCINI, P. L.; HAIMOVICI, M. Gillnet fisheries as a major mortality factor of Magellanic penguins in wintering areas. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 840-844, 2011.

CBRO. COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS. **Lista de aves do Brasil, 10a. edição**, 2011. Disponível em: <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 12 dez. 2011.

CEMAVE. CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE AVES SILVESTRES. **Projeto Nacional de Monitoramento do Pinguim-de-Magalhães *Spheniscus magellanicus***. Cabedelo: CEMAVE, 2011. 34 p.

CHEREL, Y.; FREBY, F. Daily body-mass loss and nitrogen excretion during molting fast of Macaroni penguins. **Auk**, v. 111, n. 2, p. 492-495, 1994.

CHIARADIA, A. F.; KERRY, K. R. Daily nest attendance and breeding performance in the little penguin *Eudyptula minor* at Phillip island, Australia. **Marine Ornithology**, v. 27, p. 13-20, 1999.

CIOTTI, A. M.; ODEBRECHT, C.; FILLMANN, G.; MÖLLER JR, O. O. Freshwater outflow and subtropical convergence influence on phytoplankton biomass on the southern Brazilian continental shelf. **Continental Shelf Research**, v. 15, n. 14, p. 1737-1756, 1995.

CLARKE, J. R.; KERRY, K. R. Diseases and parasites of penguins. **Korean Journal of Polar Research**, v. 4, n. 2, p. 79-96, 1993.

CLAUSEN, A.; PÜTZ, K. Winter diet and foraging range of gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) from Kidney Cove, Falkland Islands. **Polar Biology**, v. 26, p. 32-40, 2003.

DAVIS, L. S. Coordination of incubation routines and mate choice in Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*). **Auk**, v. 105, p. 428-432, 1988.

DOBSON, F. S.; JOUVENTIN, P. Use of the nest site as a rendezvous in penguins. **Waterbirds**, v. 26, n. 4, p. 409-415, 2003.

DUCHAMP, C.; ROUANET, J. L.; BARRÉ, H. Ontogeny of thermoregulatory mechanisms in king penguin chicks (*Aptenodytes patagonicus*). **Comparative biochemistry and Physiology Part A**, v. 131, p. 765-773, 2002.

DUIGNAN, P. J. Diseases of penguins. **Surveillance**, v. 28, n. 4, p. 5-11, 2001.

DSEWPC. DEPARTMENT OF SUSTAINABILITY, ENVIRONMENT, WATER, POPULATION AND COMMUNITIES. **Species profile and threats database: *Eudyptula minor* — little penguin**. 2012. Disponível em: <http://www.environment.gov.au/cgi-bin/sprat/public/publicspecies.pl?taxon_id=1085>. Acesso em: 12 dez. 2012.

FALABELLA, V.; CAMPAGNA, C.; CROXALL, J. **Atlas of the Patagonian sea: species and spaces**. Buenos Aires: Wildlife Conservation Society, BirdLife International, 2009. 304 p.

FIX, A. S.; WATERHOUSE, C.; GREINER, E. C.; STOSKOPF, M. K. *Plasmodium relictum* as a cause of avian malaria in wild-caught Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 4, p. 610-619, 1988.

FONSECA, V. S. S.; PETRY, M. V.; JOST, A. H. Diet of the Magellanic penguin on the coast of Rio Grande do Sul, Brazil. **Waterbirds**, v. 24, n. 2, p. 290-293, 2001.

FRETWELL, P. T.; LARUE, M. A.; MORIN, P.; KOOYMAN, G. L.; WIENECKE, B.; RATCLIFFE, N.; FOX, A. J.; FLEMING, A. H.; PORTER, C.; TRATHAN, P. N. An Emperor penguin population estimate: the first global, synoptic survey of a species from space. **PLOS One**, v. 7, n. 4, e33751, 2012.

GANDINI, P.; BOERSMA, P. D.; FRERE, E.; GANDINI, M.; HOLIK, T.; LICHTSCHEIN, V. Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) affected by chronic petroleum pollution along coast of Chubut, Argentina. **Auk**, v. 111, n. 1, p. 20-27, 1994.

GANDINI, P. A.; FRERE, E.; PETTOVELLO, A. D.; CEDROLA, P. V. Interaction between Magellanic penguins and shrimp fisheries in Patagonia, Argentina. **Condor**, v. 101, p. 783-789, 1999.

GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D. **Penguins: natural history and conservation**. Seattle: Washington University Press, 2013. 328 p.

GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D.; RUOPPOLO, V.; REYES, L.; REBSTOCK, G. A.; GRIOT, K.; HEREDIA, S. R.; ADORNES, A. C.; SILVA-FILHO, R. P. Chronic oil pollution harms Magellanic penguins in the Southwest Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 193-198, 2006.

GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D.; RUOPPOLO, V.; SILVA-FILHO, R. P.; ADORNES, A. C.; SENA, D. C.; VELOZO, R.; KOLESHNIKOVAS, C. M.; DUTRA, G.; MARACINI, P.; NASCIMENTO, C. C.; RAMOS-JÚNIOR, V.; BARBOSA, L.; SERRA, S. Magellanic penguin mortality in 2008 along the SW Atlantic coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 10, p. 1652-1657, 2010.

GIESE, M.; GOLDSWORTHY, S. D.; GALES, R.; BROTHERS, N.; HAMILL, J. Effects of the *Iron Baron* oil spill on little penguins (*Eudyptula minor*). III. Breeding success of rehabilitated oiled birds. **Wildlife Research**, v. 27, p. 583-591, 2000.

GOLDSWORTHY, S. D.; GIESE, M.; GALES, R.; BROTHERS, N.; HAMILL, J. Effects of the *Iron Baron* oil spill on little penguins (*Eudyptula minor*). II. Post-release survival of rehabilitated oiled birds. **Wildlife Research**, v. 27, p. 573-582, 2000.

GORDON, A. L. Brazil – Marvinas confluence – 1984. **Deep-Sea Research**, v. 36, n. 3, p. 359-384, 1989.

GRINER, L. A.; SHERIDAN, B. W. Malaria (*Plasmodium relictum*) in penguins at the San Diego Zoo. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 1, p. 7-17, 1967.

HACKETT, S. J.; KIMBALL, R. T.; REDDY, S.; BOWIE, R. C. K.; BRAUN, E. L.; BRAUN, M. J.; CHOJNOWSKI, J. L.; COX, W. A.; HAN, Kin-Lan, HARSHMAN, J.; HUDDLESTON, C. J.; MARKS, B. D.; MIGLIA, K. J.; MOORE, W. S.; SHELDON, F. H.; STEADMAN, D. W.; WITT, C. C.; YURI, T. A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. **Science**, v. 320, p. 1763-1768, 2008.

HILL, A. G.; HOWE, L.; GARTRELL, B. D.; ALLEY, M. R. Prevalence of *Leucocytozoon* spp. in the endangered yellow-eyed penguin *Megadyptes antipodes*. **Parasitology**, v. 137, n. 10, p. 1477-1485, 2010.

HOCKEN, A. G. Cause of death in blue penguins (*Eudyptula m. minor*) in North Otago, New Zealand. **New Zealand Journal of Zoology**, v. 27, p. 305-309, 2000.

HOCKEN, A. G. Necropsy findings in yellow-eyed penguins (*Megadyptes antipodes*) from Otago, New Zealand. **New Zealand Journal of Zoology**, v. 32, p. 1-8, 2005.

IUCN. INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **IUCN Red List of Threatened Species Version 2013.2**. 2014. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

JENCEK, J. E.; BEAUFRÈRE, H.; TULLY-JR, T. N.; GARNER, M. M.; BASZLER, T. V. An outbreak of *Chlamydophila psittaci* in an outdoor colony of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 26, n. 4, p. 225-231, 2012.

JONES, H. I.; SHELLAM, G. R. The occurrence of blood-inhabiting protozoa in captive and free-living penguins. **Polar Biology**, v. 21, p. 5-10, 1999a.

JONES, H. I.; SHELLAM, G. R. Blood parasites in penguins, and their potential impact on conservation. **Marine Ornithology**, v. 27, p. 181-184, 1999b.

KANE, O. J.; SMITH, J. R.; BOERSMA, P. D.; PARSONS, N. J.; STRAUSS, V.; GARCÍA-BORBOROGLU, P.; VILLANUEVA, C. Feather-loss disorder in African and Magellanic penguins. **Waterbirds**, v. 33, n. 3, p. 415-421, 2010.

KANE, O. J.; UHART, M. M.; RAGO, V.; PEREDA, A. J.; SMITH, J. R.; BUREN, A. V.; CLARK, J. A.; BOERSMA, P. D. Avian pox in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 3, p. 790-794, 2012.

KERRY, K. R.; RIDDLE, M. J. **Health of Antarctic wildlife: a challenge for science and policy**. Heidelberg: Springer, 2009. 470 p.

KEYMER, I. F.; MALCOLM, H. M.; HUNT, A.; HORSLEY, D. T. Health evaluation of penguins (Sphenisciformes) following mortality in the Falklands (South Atlantic). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 45, p. 159-169, 2001.

KINCAID, A. L.; BUNTON, T. E.; CRANFIELD, M. Herpesvirus-like infection in Black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 1, p. 173-175, 1988.

KLOKLER, D.; VILLAGRÁN, X. S.; GIANNINI, P. C. F.; PEIXOTO, S.; DeBLASIS, P. Juntos na costa: zooarqueologia e geoarqueologia de sambaquis do litoral sul catarinense. **Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia**, v. 20, p. 53-75, 2010.

KOPKE, D.; PAIVA, A. C. **Roteiro da viagem que em descobrimento da Índia pelo Cabo da Boa Esperança fez Dom Vasco da Gama em 1497**. Porto: Typographia Commercial Portuense, 1838. 183 p.

KSEPKA, D. T.; CLARKE, J. A. The basal penguin (Aves: Sphenisciformes) *Perudyptes devriesi* and a phylogenetic evaluation of the penguin fossil record. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 337, n. 1, p. 1-77, 2010.

KSEPKA, D. T.; BERTELLI, S.; GIANNINI, N. P. The phylogeny of the living and fossil Sphenisciformes (penguins). **Cladistics**, v. 22, p. 412-441, 2006.

LEVIN, I. I.; OUTLAW, D. C.; VARGAS, F. H.; PARKER, P. G. *Plasmodium* blood parasite found in endangered Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). **Biological Conservation**, v. 142, p. 3191-3195, 2009.

LINNAEUS, C. **Systema Naturae per regna tria naturae**: secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Stockholm: Laurentius Salvius, 1758. 824 p.

LISLE, G. W.; STANISLAWEK, W. L.; MOORS, P. J. *Pasteurella multocida* infections in rockhopper penguins (*Eudyptes chrysocome*) from Campbell Island, New Zealand. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, n. 2, p. 283-285, 1990.

MÄDER, A.; SANDER, M.; CASA-JR, G. Ciclo sazonal de mortalidade do pinguim-de-Magalhães, *Spheniscus magellanicus*, influenciado por fatores antrópicos e climáticos na costa do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 18, n. 3, p. 228-233, 2010.

MÜLLER-SCHWARZE, D. **The behaviour of penguins**: adapted to ice and tropics. Albany: State University of New York Press, 1984. 193 p.

NIEMEYER, C.; FAVERO, C. M.; KOLESHNIKOVAS, C. K. M.; BHERING, R. C. C.; BRANDÃO, P.; CATÃO-DIAS, J. L. Two different avipoxviruses associated with pox disease in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) along the Brazilian coast. **Avian Pathology**, v. 42, n. 6, p. 546-551, 2013.

NUMATA, M.; DAVIS, L. S.; RENNER, M. Prolonged foraging trips and egg desertion in little penguins (*Eudyptula minor*). **New Zealand Journal of Zoology**, v. 27, p. 277-289, 2000.

OBENDORF, D. L.; McCOLL, K. Mortality in little penguins (*Eudyptula minor*) along the coast of Victoria, Australia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 16, n. 2, p. 251-260, 1980.

PETTINGILL, O. S. Crèche behaviour and individual recognition in a colony of rockhopper penguins. **The Wilson Bulletin**, v. 72, n. 3, p. 213-221, 1960.

PETRY, M. V.; FONSECA, V. S. S. Effects of human activities in the marine environment on seabirds along the coast of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ornitologia Neotropical**, v. 13, p. 137-142, 2002.

PINTO, M. B. L. C.; SICILIANO, S.; DI BENEDITTO, A. P. M. Stomach contents of the Magellanic penguin *Spheniscus magellanicus* from the northern distribution limit on the atlantic coast of Brazil. **Marine Ornithology**, v. 35, p. 77-78, 2007.

PIOLA, A. R.; MATANO, R. P. The South Atlantic Western boundary currents Brazil/Falkland (Malvinas) currents. In: STEELE, J. M.; THORPE, S. A.; TUREKIAN, K. K. **Encyclopedia of Ocean Sciences**. Waltham: Academic Press, 2001. p. 340-349.

PÜTZ, K.; INGHAM, R. J.; SMITH, J. G. Satellite tracking of the winter migration of Magellanic Penguins *Spheniscus magellanicus* breeding in the Falkland Islands. **Ibis**, v. 142, p. 614-622, 2000.

PÜTZ, K.; REY, A. R.; SCHIAVINI, A.; CLAUSEN, A. P.; LÜTHI, B. H. Winter migration of rockhopper penguins (*Eudyptes c. chrysocome*) breeding in the Southwest Atlantic: is utilisation of different foraging areas reflected in opposing population trends? **Polar Biology**, v. 29, p. 735-744, 2006.

PÜTZ, K.; SCHIAVINI, A.; REY, A. R.; LÜTHI, B. H. Winter migration of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) from the southernmost distributional range. **Marine Biology**, v. 152, p. 1227-1235, 2007.

RUOPPOLO, V.; ADORNES, A. C.; NASCIMENTO, A. C.; SILVA-FILHO, R. P. Reabilitação de pinguins afetados por petróleo. **Clínica Veterinária**, v. 9, n. 51, p. 78-83, 2004.

RUOPPOLO, V.; VANSTREELS, R. E. T.; WOEHLE, E. J.; HEREDIA, S. A. R.; ADORNES, A. C.; SILVA-FILHO, R. P.; MATUS, R.; POLESCHI, C.; GRIOT, K.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; SERAFINI, P. Survival and movements of Magellanic penguins rehabilitated from oil fouling along the coast of South America, 2000–2010. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 1309-1317, 2012.

SCHERER, J. F. M.; SCHERER, A. L.; PETRY, M. V. Ocorrência de carcaças de aves marinhas no litoral do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 19, n. 4, p. 505-513, 2011.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001. 912 p.

SIMPSON, G. G. Fossil penguins. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 87, p. 1-100, 1946.

STOKES, D. L.; BOERSMA, P. D.; CASENAVE, J. L.; GARCÍA-BORBOROGLU, P. Conservation of migratory Magellanic penguins requires marine zoning. **Biological Conservation**, v. 170, p. 151-161, 2014.

STOSKOPF, M. K.; BEIER, J. Avian malaria in African black-footed penguins. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 175, n. 9, p. 944-947, 1979.

TAMINI, L. L.; PEREZ, J. E.; CHIARAMONTE, G. E.; CAPPOZZO, H. L. Magellanic penguin *Spheniscus magellanicus* and fish as bycatch in the cornalito *Sorgentina incisa* fishery at Puerto Quequén, Argentina. **Atlantic Seabirds**, v. 4, n. 3, p. 109-114, 2002.

TAYLOR, J. R. E. Thermal insulation of the down and feathers of pygoscelid penguins chicks and the unique properties of penguin feathers. **Auk**, v. 103, p. 160-168, 1986.

TOURINHO, P. S.; SUL, J. A. I.; FILLMANN, G. Is marine debris ingestion still a problem for the coastal marine biota of southern Brazil? **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 396-401, 2010.

UHART, M.; KARESH, W.; COOK, R.; HUIN, N.; LAWRENCE, K.; GUZMAN, L.; LIC, H. P.; PIZARRO, G.; MATTSSON, R.; MÖRNER, T. Paralytic shellfish poisoning in gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) from the Falkland (Malvinas) islands. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 37; 2004, San Diego. **Proceedings...** San Diego: AAZV, 2004. p. 447-482.

VAN RIPER III, C.; VAN RIPER, S. G.; GOFF, M. L.; LAIRD, M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. **Ecological Monographs**, v. 56, n. 4, p. 327-344, 1986.

VANSTREELS, R. E. T.; ADORNES, A. C.; CANABARRO, P. L.; RUOPPOLO, V.; AMAKU, M.; SILVA-FILHO, R. P.; CATÃO-DIAS, J. L. Female-biased mortality of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) on the wintering grounds. **Emu**, v. 113, n. 2, p. 128-134, 2013.

VEGA, C. M.; SICILIANO, S.; BARROCAS, P. R. G.; HACON, S. S.; CAMPOS, R. C.; JACOB, S. C.; OTT, P. H. Levels of cadmium, mercury, and lead in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) stranded on the Brazilian coast. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 460-468, 2010.

VOOREN, C. M.; BRUSQUE, L. F. **As aves do ambiente costeiro do Brasil: biodiversidade e conservação**. Rio Grande: Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 1999. 58 p.

WILLIAMS, T. D. **The penguins: Spheniscidae**. Oxford: Oxford University Press, 1995. 233 p.

WILLIAMS, T. D. Mate fidelity in penguins. In: BLACK, J. M.; HULME, M. **Partnerships in birds – the study of monogamy**. New York: Oxford University Press, 1996. 430 p.

WILLIAMS, T. D.; BOERSMA, P. D. Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). In: WILLIAMS, T. D. **The penguins: Spheniscidae**. Oxford: Oxford University Press, 1995. p. 249-258.

WILLIAMS, G.; GHEBREMESKEL, K.; KEYMER, I. F.; HORSLEY, D. T. Plasma α -tocopherol, total lipids and total cholesterol in wild rockhopper, Magellanic and gentoo penguins before and after moulting. **The Veterinary Record**, v. 124, n. 2, p. 585-586, 1989.

WILSON, R. P.; SCOLARO, J. A.; GRÉMILLET, D.; KIERSPEL, M. A. M.; LAURENTI, R. P.; UPTON, J.; GALLELLI, H.; QUINTANA, F.; FRERE, E.; MÜLLER, G.; STRATEN, M. T.; ZIMMER, I. How do Magellanic penguins cope with variability in their access to prey? **Ecological Monographs**, v. 75, n. 3, p. 379-401, 2005.

WOLDFART, A. C.; WILLIAMS, A. J.; UNDERHILL, L. G.; CRAWFORD, R. J. M.; WHITTINGTON, P. A. Review of the rescue, rehabilitation and restoration of oiled seabirds in South Africa, especially African penguins *Spheniscus demersus* and Cape gannets *Morus capensis*, 1983–2005. **African Journal of Marine Science**, v. 31, n.1, p. 31-54, 2009.

XAVIER, M. O.; SOARES, M. P.; MEINERZ, A. R. M.; NOBRE, M. O.; OSÓRIO, L. G.; SILVA-FILHO, R. P.; MEIRELES, M. C. A. Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive Magellanic penguins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 480-484, 2007.

YABSLEY, M. J.; PARSONS, N. J.; HORNE, E. C.; SHOCK, B. C.; PURDEE, M. Novel relapsing fever *Borrelia* detected in African penguins (*Spheniscus demersus*) admitted to two rehabilitation centers in South Africa. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1125-1130, 2012.

3 MALÁRIA AVIÁRIA E OUTROS HEMOSPORIDIANOS AVIÁRIOS

3.1 INTRODUÇÃO

Malária aviária é um termo genérico utilizado para descrever as enfermidades causadas por uma grande variedade de hemoparasitas que acometem aves. Embora estes parasitas sejam relacionados àqueles que causam a malária em humanos e outros mamíferos, os significados clínico e epidemiológico da malária aviária são muito distintos e demandam o seu estudo separado. O termo “malária aviária” é tradicionalmente reservado à enfermidade causada pela infecção por protozoários do gênero *Plasmodium*, porém outros hemosporidianos como *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Fallisia* são frequentemente agrupados por sua proximidade taxonômica e suas similaridades epidemiológicas e patológicas (PÉREZ-TRIS et al., 2005; VALKIŪNAS, 2005).

As infecções por hemosporidianos em aves tipicamente são subclínicas ou resultam apenas em alterações clínicas discretas mas, em casos particulares ou em aves altamente suscetíveis, pode levar a quadros clínicos graves e até ao óbito. Há dois grupos taxonômicos de aves que são particularmente sensíveis à infecção plasmódica: os pinguins (Spheniscidae) e os “honeycreepers” do Havaí (Fringillidae: Drepanidinae); no entanto, casos clínicos severos e surtos epizooticos também são esporadicamente relatados em outras aves (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008b). Dentre as espécies de aves com ocorrência no Brasil, a malária aviária recebe particular importância entre os pinguins, em especial o pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), em que é considerada uma das enfermidades de maior relevância durante a reabilitação e manutenção em cativeiro (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2007).

3.2 ETIOLOGIA

Hemosporidianos (Apicomplexa: Aconoidasida: Haemosporida) são um grupo de protozoários obrigatoriamente heteroxênicos, cujo ciclo de vida envolve vertebrados e insetos hematófagos (tipicamente, moscas hematófagas e mosquitos). Os hemoparasitas piroplasmídeos (*Babesia*, *Hepatozoon*, *Theileria*, entre outros) são as espécies filogeneticamente mais próximas. Há mais de duas centenas de espécies de hemosporidianos que podem infectar aves, embora este número esteja em constante rearranjo taxonômico e novas espécies ainda sejam descritas com frequência. Não há relatos de hemosporidianos aviários sendo transmitidos a espécies não-aviárias, de modo que se aceita que estes parasitas não apresentam risco zoonótico. Os hemosporidianos aviários são divididos em quatro gêneros com características epidemiológicas e patológicas distintas (Quadro 3.1): *Haemoproteus* (143 spp.), *Plasmodium* (60 spp.), *Leucocytozoon* (36 spp.) e *Fallisia* (1 sp) (PEIRCE, 2005; VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008a,b; FORRESTER; GREINER, 2008).

Quadro 3.1 - Sumário comparativo dos gêneros de hemosporidianos aviários

	<i>Haemoproteus</i> (Pseudo-malária)	<i>Plasmodium</i> (Malária aviária)	<i>Leucocytozoon</i> (Leucocitozoonose)
No. de espécies acometendo aves	143	60	36
No. de ordens de aves acometidas	19	20	18
Hospedeiro invertebrado	Ceratopogonidae, Hippoboscidae	Culicidae	Ceratopogonidae, Simuliidae
Capacidade de alternar hospedeiros vertebrados	Baixa	Elevada	Intermediária
Patogenicidade	Baixa - Moderada	Baixa - Elevada	Baixa - Moderada
Merogonia eritrocítica	Ausente	Presente	Ausente
Formação de megalomerontes	Presente	Ausente	Presente

O gênero *Haemoproteus* destaca-se por sua grande diversidade de espécies, limitada flexibilidade em alternar espécies de hospedeiro, baixa patogenicidade e alta prevalência. O gênero compreende um grande número de espécies, divididas em dois

subgêneros: *Haemoproteus* e *Parahaemoproteus*. Os subgênero *Haemoproteus* possui poucas espécies (8 spp.), é veiculado por moscas da família Hippoboscidae, e acomete apenas aves da ordem Columbiformes (pombos e rolinhas) e algumas aves marinhas (Pelecaniformes e Charadriiformes). O subgênero *Parahaemoproteus* é mais numeroso em espécies (137 spp.), é veiculado por moscas da família Ceratopogonidae e acomete uma grande variedade de aves. Há similaridades morfológicas das formas parasitárias nos hospedeiros vertebrados, porém os parasitas destes subgêneros são facilmente distinguíveis quando nos hospedeiros invertebrados (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008a; LEVIN et al., 2011, 2012).

O gênero *Plasmodium* apresenta uma diversidade moderada de espécies e uma grande flexibilidade em alternar espécies de hospedeiro, moderada a severa patogenicidade e, geralmente, baixa prevalência. Estes parasitas são veiculados por mosquitos da família Culicidae. Os plasmódios que infectam aves são divididos em cinco subgêneros (*Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella*, *Bennettinia*, *Huffia*). A morfologia das formas parasitárias no hospedeiro vertebrado é distinta entre os subgêneros, porém as diferenças epidemiológicas ou patológicas são muito sutis (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008b).

O gênero *Leucocytozoon* possui uma diversidade moderada de espécies, uma flexibilidade limitada em alternar espécies de hospedeiro, com moderada patogenicidade e prevalência muito variável. As espécies que acometem as aves são classificadas em dois subgêneros: *Akiba* e *Leucocytozoon*. O subgênero *Akiba* é representado por uma única espécie, *L. caulleryi*, descrita em galinhas domésticas no sudeste asiático e que se diferencia por ter moscas da família Ceratopogonidae como hospedeiros invertebrados. O subgênero *Leucocytozoon*, por outro lado, conta com uma grande quantidade de espécies (35 spp.) infectando uma ampla variedade de espécies de aves, veiculadas por moscas da família Simuliidae (VALKIŪNAS, 2005; FORRESTER; GREINER, 2008).

Por fim, o gênero *Fallisia* destaca-se por apresentar uma única espécie acometendo aves, *F. neotropicalis* (subgênero *Plasmodioides*). A espécie é considerada um achado raro, só tendo sido relatada na Venezuela, acometendo Ciconiiformes e Columbiformes. A morfologia das formas parasitárias em trombócitos, linfócitos e monócitos das aves é característica e facilmente diferenciada de outros

hemoparasitas. Seu hospedeiro invertebrado é desconhecido, especulando-se que seja um mosquito pertencente à família Culicidae, *Aedeomyia squamipennis* (GABALDÓN et al., 1985). Por ser incomum e relativamente pouco conhecido, este parasita não será discutido extensivamente nesse capítulo, enquanto um maior enfoque será dado aos demais gêneros.

Há alguma controvérsia acerca da terminologia “malária aviária”. Há autores que consideram que as enfermidades resultantes das infecções por *Plasmodium* e *Haemoproteus* devem ser denominadas desta forma, enquanto outros argumentam que apenas moléstias associadas ao *Plasmodium* deveriam receber tal denominação (RICKLEFS; FALLON, 2002; PÉREZ-TRIS et al., 2005). No contexto do presente capítulo, adotaremos a distinção entre “malária aviária” (*Plasmodium*), “pseudo-malária” (*Haemoproteus*) e, ainda, “leucocitozoonose” (*Leucocytozoon*).

3.3 EPIZOOTIOLOGIA

Nos hemosporidianos, o invertebrado é o hospedeiro definitivo no qual ocorre a reprodução sexuada do parasita, enquanto a ave é o hospedeiro intermediário, essencial ao desenvolvimento do parasita, porém no qual não há reprodução sexuada. Tipicamente a infecção da ave é feita pela inoculação de esporozoítos durante a hematofagia do hospedeiro invertebrado, porém a inoculação de sangue contendo merontes eritrocíticos também pode ser uma via de infecção iatrogênica (apenas em *Plasmodium*, uma vez que *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* não possuem merontes circulantes), podendo ocorrer acidentalmente em procedimentos clínicos ou intencionalmente em estudos de infecção experimental (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008a,b; FORRESTER; GREINER, 2008).

3.3.1 Ciclo de vida de *Plasmodium* e *Haemoproteus*

O ciclo do gênero *Plasmodium* será descrito primeiramente (Figura 3.1) (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008b), e posteriormente serão destacadas as variações que ocorrem em *Haemoproteus*. Durante a alimentação do invertebrado hematófago, são inoculados esporozoítos (a) na ave. Os esporozoítos invadem células endoteliais e mononucleares fagocíticas de vários tecidos (em especial baço e pele) (b) e originam criptozoítos (c) que se desenvolvem por reprodução assexuada, e finalmente se rompem liberando grandes quantidades de merozoítos (d); este ciclo é denominado merogonia exoeritrocítica primária. Os merozoítos ganham a circulação sanguínea, e atingem novas células endoteliais e mononucleares fagocíticas (sobretudo no pulmão, baço, fígado e medula óssea), onde formam metacriptozoítos (também denominados merontes teciduais ou esquizontes teciduais) (e), que se desenvolvem por reprodução assexuada (f) e rompem-se liberando uma grande quantidade de merozoítos (g); este ciclo é denominado merogonia exoeritrocítica secundária. Vale notar que, ao contrário da malária humana, não há um estágio hepático em que o parasita se multiplique em hepatócitos.

Os merozoítos (h) resultantes desta etapa poderão então seguir quatro destinos distintos, dependendo de fatores endógenos e das condições do hospedeiro. Alguns podem retornar ao ciclo de merogonia exoeritrocítica secundária. Outros podem invadir células sanguíneas, tipicamente eritrócitos, desenvolvendo-se em trofozoítos (i) que por reprodução assexuada transformam-se em merontes eritrocíticos (também denominados esquizontes eritrocitários) (j), e finalmente rompem-se liberando moderadas quantidades de merozoítos (k); este ciclo é denominado merogonia eritrocítica. Outra opção que pode ser seguida pelos merozoítos é invadir células endoteliais e mononucleares fagocíticas (desta vez, em uma variedade de tecidos) (l), e desenvolver-se por reprodução assexuada em fanerozoítos (também denominados merontes teciduais ou esquizontes teciduais) (m) e assim podem permanecer por períodos prolongados, até que finalmente rompem-se e liberam quantidades muito grandes de merozoítos (n); este ciclo secundário de reprodução assexuada é denominado merogonia exoeritrocítica terciária. Finalmente, uma última opção de

destino dos merozoítos é de invadir células sanguíneas (tipicamente eritrócitos) e desenvolver-se em trofozoítos (o), que posteriormente desenvolvem-se nas formas sexuais do parasita, macrogametócitos (p) e microgametócitos (q); esta fase de desenvolvimento é denominada gametogonia. Os gametócitos permanecem nos eritrócitos circulantes por períodos prolongados, mas não se desenvolvem adicionalmente até serem ingeridos por um invertebrado hematófago que venha a alimentar-se do sangue do vertebrado.

O ciclo de vida de *Haemoproteus* assemelha-se ao de *Plasmodium*, com algumas diferenças importantes. A diferença mais relevante é de que apenas *Plasmodium* realiza a merogonia eritrocítica, isto é, em *Haemoproteus* a reprodução assexuada ocorre unicamente nas células endoteliais e mononucleares fagocíticas, e não nos eritrócitos. Assim, as únicas formas parasitárias circulantes encontradas nas infecções por *Haemoproteus* são os trofozoítos e gametócitos; a identificação de merontes eritrocíticos (esquizontes) é evidência conclusiva de que há infecção por *Plasmodium*. Além disso, durante a merogonia extraeritrocitária, *Haemoproteus* pode alternativamente formar uma forma especial de merontes teciduais, os megalomerontes (também denominados megaloesquizontes). Os megalomerontes são formados através da invasão de células endoteliais e miofibroblastos pelos merozoítos (principalmente em musculatura estriada), com a formação de merontes teciduais excepcionalmente grandes, que levam 15-20 dias para desenvolver-se completamente, cada um com dezenas de milhares de merozoítos. Os merozoítos que emergem destes megalomerontes passam à gametogonia e resultam em grandes quantidades de gametócitos, servindo como um mecanismo para potencializar a transmissão aos hospedeiros invertebrados durante o período sazonal favorável (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008a).

Figura 3.1 - Ciclo de vida de *Plasmodium* spp que infectam aves

Fonte: Valkiūnas (2005), adaptação de Vanstreels (2014)

Legenda: (a) esporozoíto, (b) criptozoíto jovem, (c) criptozoíto maduro, (d) criptozoíto rompe-se liberando merozoítos, (e) metacriptozoíto jovem, (f) metacriptozoíto maduro, (g) metacriptozoíto rompe-se liberando merozoítos, (h) merozoítos, (i) trofozoíto, (j) meronte eritrocítico, (k) meronte eritrocítico rompe-se liberando merozoítos, (l) fanerozoíto jovem, (m) fanerozoíto maduro, (n) fanerozoíto rompe-se liberando merozoítos, (o) trofozoítos, (p) macrogametócito, (q) microgametócito, (r) macrogameta, (s) microgameta exflagelado, (t) oocineto móvel, (u) oocineto móvel invade lâmina basal, (v) oocisto, (w) oocisto rompe-se liberando esporozoítos, (x) esporozoítos instalam-se nas glândulas salivares

3.3.2 Ciclo de vida de *Leucocytozoon*

O ciclo de *Leucocytozoon* possui diferenças importantes em relação aos de *Plasmodium* e *Haemoproteus* (Figura 3.2) (VALKIŪNAS, 2005; FORRESTER; GREINER, 2008). Durante a alimentação do invertebrado hematófago, esporozoítos (a) são inoculados na ave. Os esporozoítos invadem hepatócitos (b) e originam merontes hepáticos (também denominados esquizontes hepáticos) (c) que se desenvolvem por

reprodução assexuada, e finalmente se rompem (d) liberando grandes quantidades de sincícios (e) e merozoítos (f); este ciclo é denominado merogonia primária. Os sincícios são fragmentos multinucleados, enquanto os merozoítos são mononucleados. Os sincícios são fagocitados por macrófagos em diversos tecidos (baço, fígado, encéfalo, entre outros) (g) e originam megalomerontes (também denominados megaloesquizontes) (h), que se multiplicam por reprodução assexuada, e finalmente se rompem liberando milhares de merozoítos (i); este ciclo é denominado merogonia secundária.

Figura 3.2 - Ciclo de vida de *Leucocytozoon* spp.

Fonte: Valkiūnas (2005), adaptação de Vanstreels (2014)

Legenda: (a) esporozoíto, (b) meronte hepático jovem, (c) meronte hepático maduro, (d) meronte hepático rompe-se liberando sincícios e merozoítos, (e) sincícios, (f) merozoítos, (g) sincício invade parede endotelial, (h) megalomeronte, (i) megalomeronte rompe-se liberando merozoítos, (j) merozoítos em eritrócitos, (k) macrogametócito arredondado, (l) microgametócito arredondado, (m) merozoítos em leucócitos, (n) macrogametócito fusiforme, (o) microgametócito fusiforme, (p) macrogameta, (q) microgameta exflagelado, (r) oocineto móvel, (s) oocineto móvel invade lâmina basal, (t) oocisto, (u) oocisto rompe-se liberando esporozoítos, (v) esporozoítos instalam-se nas glândulas salivares

Os merozoítos produzidos a partir da merogonia primária poderão retomar o ciclo no qual se originaram, ou então proceder à invasão de eritrócitos (j) e desenvolverem-se nas formas sexuais arredondadas do parasita: o macrogametócito arredondado (k) e o microgametócito arredondado (l). Esta etapa é denominada gametogonia eritrocitária. Por outro lado, os merozoítos resultantes da merogonia secundária terão um destino diferente, podendo retornar tanto às merogonias primária ou secundária, ou ainda proceder à invasão de leucócitos mononucleados. Ao invadir os monócitos e linfócitos circulantes (m), eles se desenvolverão nas formas sexuais fusiformes do parasita, o macrogametócito fusiforme (n) e o microgametócito fusiforme (o); esta etapa é denominada gametogonia leucocitária. À semelhança do que ocorre nos demais hemosporidianos, os gametócitos permanecem circulantes por períodos prolongados até serem ingeridos por um inseto hematófago. As etapas subsequentes à ingestão dos gametócitos pelo hospedeiro invertebrado seguem-se de modo idêntico ao descrito anteriormente para *Plasmodium*, e as formas arredondadas e fusiformes de gametócitos comportam-se de modo semelhante ao desenvolverem-se em macro e microgametas (VALKIŪNAS, 2005).

3.4 EPIDEMIOLOGIA

3.4.1 Distribuição nos hospedeiros invertebrados

Apenas insetos dípteros (Arthropoda: Insecta: Diptera) foram identificados como hospedeiros e transmissores dos hemosporidianos aviários (Figura 3.3). Embora outros invertebrados hematófagos (piolhos, carrapatos, pulgas, etc.) tenham sido extensivamente pesquisados, nunca foram identificados como hospedeiros ou vetores competentes. O subgênero *Parahaemoproteus* é veiculado por moscas da família Ceratopogonidae (miruim, mosquito-pólvora), gênero *Culicoides*. O subgênero *Haemoproteus* é veiculado por moscas da família Hippoboscidae (mosca-de-pomba), sobretudo *Pseudolynchia*, mas também *Ornithomyia*, *Stilbometopa*, *Lynchia* e

Microlynchia. O gênero *Plasmodium* é veiculado por mosquitos Culicidae (mosquito, pernilongo), sobretudo *Culex* e também *Mansonia*, *Culiseta* e *Aedeomyia*; também foi demonstrado que em condições laboratoriais *Aedes*, *Anopheles* e *Armigeres* podem ser hospedeiros competentes. *Leucocytozoon* é veiculado por moscas da família Simuliidae (borrachudo, mosca-preta), sobretudo *Simulium* e *Prosimulium*, mas também *Cnephia*, *Austrosimulium* e *Eusimulium*; exceção no seu grupo, *Leucocytozoon caulleryi* é veiculado por moscas da família Ceratopogonidae, gênero *Culicoides*. (ATKINSON, 2008a,b; FORRESTER; GREINER, 2008)

É importante notar que uma espécie de hemosporidiano pode ser flexível e ter vários hospedeiros invertebrados competentes, adaptando-se de modo oportunista à disponibilidade destes insetos na região e época do ano. Por exemplo, *Plasmodium relictum*, uma espécie cosmopolita e extensivamente estudada, já teve pelo menos 26 espécies de mosquitos identificados como potenciais hospedeiros (VALKIŪNAS, 2005).

Figura 3.3 - Insetos hematófagos que atuam como hospedeiros de hemosporidianos aviários

Fonte: Valkiūnas (2005), adaptação de Vanstreels (2014)

3.4.2 Distribuição nas aves hospedeiras

Estima-se que até o momento a ocorrência de hemosporidianos já tenha sido investigada em cerca de metade das espécies de aves e, dentre estas, *Haemoproteus* ocorre em ~50% das espécies aviárias pesquisadas, enquanto *Plasmodium* e *Leucocytozoon* ocorrem em ~30% cada (Figura 3.4). Tem sido proposto que os hemosporidianos, particularmente *Haemoproteus*, são parasitas de evolução recente e paralela à divergência das taxa modernos de aves (BENNETT et al., 1993; PEIRCE, 2005; VALKIŪNAS, 2005; HELLGREN et al., 2009).

Figura 3.4 - Distribuição do número de espécies registradas de hemosporidianos nas diversas ordens aviárias

	<i>Haemoproteus</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>Leucocytozoon</i>	Total
Passeriformes	63	16	7	86
Psittaciformes	2	5	-	7
Falconiformes	6	5	1	12
Coraciiformes	10	4	4	18
Piciformes	9	8	1	18
Trogoniformes	1	-	-	1
Strigiformes	2	5	1	8
Coliiformes	1	-	1	2
Charadriiformes	5	2	2	9
Gruiformes	5	8	1	15
Cuculiformes	1	2	1	4
Sphenisciformes	1	4	1	6
Ciconiiformes	4	4	2	10
Pelecaniformes	-	1	1	2
Musophagiformes	1	1	1	3
Columbiformes	6	11	1	18
Apodiformes	4	3	-	7
Caprimulgiformes	1	3	1	5
Anseriformes	2	9	1	12
Galliformes	9	17	7	33
Tinamiformes	-	4	-	3
Struthioniformes	-	-	1	1

Fonte: Valkiūnas (2005) e Hackett et al. (2008), adaptação de Vanstreels (2014)

De modo geral, os parasitas do gênero *Haemoproteus* são mais específicos e possuem alguma flexibilidade para alternar entre aves da mesma família taxonômica, porém são raríssimos os casos de alternância entre ordens taxonômicas de hospedeiro. A maioria das espécies de *Leucocytozoon* apresenta uma flexibilidade dentro da mesma família ou ordem taxonômica, porém tipicamente a alternância entre ordens seja considerada infrequente. No caso de *Plasmodium*, por outro lado, a flexibilidade de alternância de hospedeiros é bem conhecida, e várias espécies podem possuir hospedeiros competentes em ordens taxonômicas distintas. Por exemplo, *P. relictum* já foi identificado em mais de 400 espécies de aves distribuídas em 11 ordens. Estas diferenças de flexibilidade em alternar hospedeiros devem ser considerada para fins de manejo e prevenção da enfermidade em populações cativas e em vida livre, pois determinará a quantidade de hospedeiros reservatórios de infecção em potencial (BENNETT et al., 1993; PEIRCE, 2005; VALKIŪNAS, 2005; HELLGREN et al., 2009).

Algumas aves são particularmente sensíveis à infecção por *Plasmodium*. Embora haja relatos isolados de casos letais de infecção plasmódica em uma variedade de aves domésticas e silvestres, casos epizooticos são muito mais raros, e destacam-se como altamente suscetíveis os pinguins (Sphenisciformes) e algumas aves nativas do Havaí, os “honeycreepers” (Passeriformes: Drepanidinae) (VAN RIPER III et al., 1986; ATKINSON et al., 2001; ATKINSON, 2008b). Sugere-se que a razão para esta alta suscetibilidade esteja relacionada ao fato de que estas aves não terem convivido evolutivamente com hemosporidianos e, por este motivo, não teriam desenvolvido as respostas imunológicas apropriadas para lidar com estes parasitas (VALKIŪNAS, 2005). No caso dos pinguins, as espécies tipicamente envolvidas são *P. relictum* e *P. elongatum* (a primeira tende a produzir quadros clínicos mais severos), mas também há relatos de infecção por *P. juxtanucleare* (GRINER; SHERIDAN, 1967; GRACZYK et al., 1994a; GRIM et al., 2003). Casos de morbidade ou mortalidade em massa associada a *Haemoproteus* ou *Leucocytozoon* são mais raros, e geralmente estão associados a condições atípicas de exposição de aves a hemosporidianos com os quais não coevoluíram (VALKIŪNAS, 2005).

3.4.3 Distribuição geográfica, sazonalidade e sincronicidade

A epidemiologia dos hemosporidianos é complexa e está diretamente ligada à sua dependência de hospedeiros invertebrados e vertebrados, cada um apresentando condições e desafios distintos. No hospedeiro invertebrado, a temperatura é o principal fator limitante. Considera-se que a temperatura ótima seja em torno de 25°C para a maioria das espécies, sendo que a esporogonia pode ser suspensa abaixo de 13°C e a deterioração dos oocistos ocorra abaixo dos 4°C. No entanto, há espécies que realizam esporogonia em temperaturas mais baixas (*p.e.* algumas espécies de *Leucocytozoon* apresentam temperatura ótima de 15°C). Em baixas temperaturas, os insetos hospedeiros podem ter dificuldade para sobreviver e reproduzir, constituindo um limitante adicional à ocorrência dos hemosporidianos em regiões ou estações frias. No hospedeiro vertebrado, a resposta imune é o principal limitante. Além disso, muitos hemosporidianos são capazes de ficar latentes por períodos prolongados e causar relapsos em resposta a estímulos hormonais (sobretudo corticóides), alterações de fotoperíodo ou condições de estresse ou desafios imunológicos. Este padrão é particularmente evidente em muitas espécies de *Haemoproteus*, em que os “relapsos de primavera” são um fator determinante na epidemiologia destes parasitas (ATKINSON; VAN RIPER III, 1991; CRANFIELD et al., 1994; ATKINSON et al., 2001; BENNING et al., 2002; VALKIŪNAS, 2005).

Por esta dependência da temperatura ambiente e da presença e contato direto de hospedeiros invertebrados e vertebrados competentes, os hemosporidianos possuem padrões complexos de distribuição de acordo com a sazonalidade e as regiões geográficas. Em regiões tropicais, os hemosporidianos costumam disseminar-se durante todo o ano. Em regiões temperadas, no entanto, essa distribuição tende a tornar-se fortemente dependente da sazonalidade, com elevada parasitemia e transmissão por invertebrados durante a primavera-verão, e um período de latência e ausência de parasitemia durante o outono-inverno. A sazonalidade nos hábitos de vida das aves migratórias também pode afetar profundamente o ciclo dos parasitas, sendo que estes poderão se concentrar nos sítios de repouso invernal e permanecer em latência durante a fase reprodutiva, ou vice-versa. Esta distribuição também é

modulada pela topografia e altitude: regiões de altitude elevada podem não apresentar condições apropriadas à existência dos hemosporidianos, regiões de altitude intermediária podem apresentar uma ocorrência estritamente sazonal de hemosporidianos, e em regiões de baixa altitude os hemosporidianos podem ocorrer de modo permanente. Por razões ainda pouco compreendidas, a região Neotropical apresenta diversidade e prevalência consideravelmente baixas de hemosporidianos aviários quando comparada às outras regiões tropicais, em especial no caso de *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* (Figura 3.5, Quadro 3.2) (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008a,b; FORRESTER; GREINER, 2008).

Além disso, os hemosporidianos podem ter graus variáveis de ciclicidade e sincronicidade em função do ciclo circadiano e da cronologia da infecção no hospedeiro vertebrado. Em algumas espécies, pode ser observado um ciclo circadiano bem demarcado, com picos de parasitemia em intervalos fixos de horas ou dias. A presença desta ciclicidade, que varia muito entre espécies, pode influenciar a realização de provas diagnósticas, resultando em parasitemia particularmente elevada ou reduzida dependendo do horário da colheita sanguínea (VALKIŪNAS, 2005).

Figura 3.5 - Distribuição do número de espécies registradas de hemosporidianos aviários, e respectivas prevalências médias, em função das regiões biogeográficas

Fonte: Valkiūnas (2005), adaptação de Vanstreels (2014)

Quadro 3.2 - Lista de espécies de hemosporidianos aviários registrados na região Neotropical

Gênero	Subgênero	Espécies
Haemoproteus	<i>Parahaemoproteus</i>	<i>H. archilochus</i> , <i>H. apodus</i> , <i>H. borgesii</i> , <i>H. buconis</i> , <i>H. circumnuclearis</i> , <i>H. coatneyi</i> , <i>H. cracidarum</i> , <i>H. fallisi</i> , <i>H. formicarius</i> , <i>H. fringillae</i> , <i>H. fumarius</i> , <i>H. handai</i> , <i>H. noctuae</i> , <i>H. nettionis</i> , <i>H. ortolidum</i> , <i>H. passeris</i> , <i>H. quiscalus</i> , <i>H. souzalopesis</i> , <i>H. syrnii</i> , <i>H. trochili</i> , <i>H. trogonis</i> , <i>H. tyranni</i> , <i>H. vireonis</i> , <i>H. wenyoni</i> , <i>H. witti</i>
	<i>Haemoproteus</i>	<i>H. columbae</i> , <i>H. lutzi</i> , <i>H. sacharovi</i>
Plasmodium	<i>Haemamoeba</i>	<i>P. cathemerium</i> , <i>P. lutzi</i> , <i>P. relictum</i> , <i>P. tejera</i>
	<i>Giovannolaia</i>	<i>P. circumflexum</i> , <i>P. gabaldoni</i> , <i>P. pedioecetae</i> , <i>P. pinottii</i> , <i>P. polare</i>
	<i>Novyella</i>	<i>P. bertii</i> , <i>P. columbae</i> , <i>P. hexamerium</i> , <i>P. nucleophilum</i> , <i>P. paranucleophilum</i> , <i>P. vaughani</i>
	<i>Bennettinia</i>	<i>P. juxtannucleare</i>
	<i>Huffia</i>	<i>P. elongatum</i> , <i>P. huffi</i>
Leucocytozoon	<i>Leucocytozoon</i>	<i>L. danilewskyi</i> , <i>L. dubreuilii</i> , <i>L. fringillinarum</i> , <i>L. majoris</i> , <i>L. marchouxi</i>
Fallisia	<i>Plasmodioides</i>	<i>F. neotropicalis</i>

Fonte: Bennett et al. (1993) e Valkiūnas (2005), adaptação de Vanstreels (2014)

3.5 PATOGENIA

Será enfocada aqui primeiramente a patogenia das infecções por *Plasmodium*, para posteriormente ser apresentadas as particularidades de *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*.

Após a inoculação de esporozoítos no hospedeiro vertebrado por meio da picada do inseto, há um período pré-patente antes da emergência das primeiras formas parasitárias sanguíneas. Este período é assintomático e varia de 5-10 dias. A partir do surgimento das primeiras formas sanguíneas, a parasitemia cresce rapidamente até atingir um pico, a fase de crise, aproximadamente no 21º dia pós-infecção (6-12 dias após o início da parasitemia) (Figura 3.6). A crise persiste por aproximadamente 7 dias, e então a parasitemia diminui gradualmente até chegar aos níveis crônicos de infecção. Uma crise secundária pode ocorrer aproximadamente ao 35º dia pós-infecção, e outras poderão ocorrer posteriormente de forma esporádica. É importante notar que esta

cronologia aplica-se a infecções experimentais em aves domésticas, e que aves silvestres em condições de campo poderão apresentar um desenvolvimento cronológico variável (ATKINSON; VAN RIPER III, 1991; ATKINSON et al., 2001; VALKIŪNAS, 2005).

Na fase de crise, tipicamente há boa correlação entre parasitemia periférica e a apresentação clínica da doença. A parasitemia resulta em hemólise de eritrócitos parasitados e não parasitados, levando a decréscimos de hematócrito e hemoglobina, acompanhado de resposta regenerativa (aumento de eritrócitos jovens), e produção de derivados da biliverdina, tornando as fezes esverdeadas. Durante este estágio, haverá uma resposta aguda à infecção com aumento de γ -globulinas e linfócitos. Em algumas aves observa-se hipertermia associada à síndrome febril, mas em outras prevalece a hipotermia devido à inabilidade de termorregulação (FIX et al., 1988; ATKINSON; VAN RIPER III, 1991; ATKINSON et al., 2001; WILLIAMS, 2005).

A hemólise intravascular e fagocitose de células parasitadas resultam no acúmulo de hemossiderina em macrófagos viscerais e, em casos mais severos, à hemossiderose, especialmente hepática. Paralelamente, a presença de merontes teciduais em células endoteliais e macrófagos teciduais resulta em vasculite e inflamação difusa do parênquima nos diversos tecidos acometidos. As lesões clássicas incluem espleno e hepatomegalia por congestão, edema e hiperplasia devido a infiltrados mononucleares. Graus variáveis de inflamação aguda a crônica em resposta à presença dos merontes teciduais podem ocorrer, com presença de infiltrado heterofílico, congestão, edema e hemorragia. A circulação pobre de oxigênio devido à redução de hemoglobina e hematócrito, em associação à aglutinação de eritrócitos (tromboses e tromboembolismos) e ao bloqueio mecânico dos vasos por merontes teciduais, podem levar a múltiplos focos diminutos de hipóxia tecidual e hemorragia, acompanhados de aumento de permeabilidade vascular e edema. Estas alterações multifocais de degeneração e necrose podem ocorrer em uma variedade de tecidos, incluindo a musculatura esquelética, coração, baço, fígado, pulmões, rins, entre outros (SONI; COX, 1974, 1975a,b,c; FIX et al., 1988; ATKINSON; VAN RIPER III, 1991; VALKIŪNAS, 2005; WILLIAMS, 2005).

Figura 3.6 - Diagrama conceitual da evolução da parasitemia na prima-infecção plasmódica de uma ave suscetível

Fonte: Valkiūnas (2005), adaptação de Vanstreels (2014)

Em pinguins, a intensa inflamação do parênquima pulmonar, com marcante infiltração heterofílica, congestão e edema severos, poderá se tornar tão severa a ponto de levar à insuficiência respiratória e óbito. Outras alterações associadas, como esplenite necrotizante e hepatite aguda, também comprometem o quadro. Finalmente, em alguns casos a efusão pericárdica decorrente da vasculite pode tomar proporções tão marcantes que prejudicará a função cardíaca, complicando ainda mais a perfusão sanguínea. A pressão sanguínea reduzida, perda de eritrócitos e hemoglobina circulantes, desequilíbrios eletrolíticos, retardo da coagulação e insuficiência respiratória poderão se combinar e levar à hipoperfusão e ao quadro de choque. O bloqueio de capilares cerebrais pelos merontes teciduais ou por trombos e tromboembolismos, possivelmente associado à hipoperfusão generalizada e à anemia, também pode levar à hipóxia cerebral, com sinais clínicos neurológicos como convulsão, paralisia e morte (RODHAIN, 1939; GRINER; SHERIDAN, 1967; FLEISCHMAN et al., 1968a; BAK et al., 1984; FIX et al., 1988; DINOHPL et al., 2011).

Passeriformes experimentalmente infectados por *Plasmodium* apresentam respostas imunes humorais e celulares vigorosas, porém são incapazes de eliminar completamente o parasita, desenvolvendo uma infecção crônica. Neste caso, a parasitemia persistirá baixa (por vezes indetectável), com episódios esporádicos de recrudescência. A recrudescência pode ocorrer em momentos de imunossupressão do

hospedeiro (corticosterona) ou em resposta à sazonalidade (melatonina e corticosterona). Em infecções por *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*, a ocorrência de relapsos de primavera é bem definida e tem papel central na epidemiologia destes parasitas. Para *Plasmodium*, episódios de estresse e tratamentos com corticóides induzir a recrudescência em animais clinicamente curados e livres de parasitemia por longos períodos (ATKINSON; VAN RIPER III, 1991; CRANFIELD et al., 1994; ATKINSON et al., 2001).

Recrudescências e reinfecções são tipicamente menos severas que a primeira infecção. Pouco se sabe sobre o papel da imunidade adquirida em conter recidivas ou evitar que reinfecções sejam clinicamente severas, mas observa-se que pinguins-Africanos (*Spheniscus demersus*) que entraram em contato com a doença apresentam uma aparente resiliência à re-infecção, desenvolvendo parasitemias baixas e quadros clínicos mais brandos. Testes imunoenzimáticos revelaram elevada reatividade cruzada de anticorpos entre *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*, e é provável que espécies distintas de *Plasmodium* também apresentem acentuada reatividade cruzada. Não se sabe, no entanto, se a imunidade adquirida contra um destes parasitas se reflete efetivamente em resiliência à infecção por outros hemosporidianos. Outros fatores imunológicos também podem estar envolvidos, e coinfeções por vírus e bactérias poderão atuar sinergicamente com os hemosporidianos e produzir quadros potencialmente mais severos e letais (ATKINSON; VAN RIPER III, 1991; GRACZYK et al., 1994a; CRANFIELD et al., 1994; ATKINSON et al., 2001; VALKIŪNAS, 2005).

A patogenia das infecções por *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* foi menos estudada, devido à menor severidade destes processos. O período pré-patente tende a ser mais longo, cerca de 14 dias em *Leucocytozoon*, 7-17 dias no subgênero *Parahaemoproteus*, e 17-37 dias no subgênero *Haemoproteus*. Predominam as lesões musculares, com focos de hemorragia e infiltração mononuclear. Estudos de infecção experimental com diversas espécies de *Haemoproteus* muitas vezes não encontraram quaisquer lesões teciduais importantes. Mesmo nos casos em que os merontes teciduais são abundantes em pulmão, baço, fígado e outros tecidos, tipicamente observa-se apenas discreta inflamação com infiltrados mononucleares e figuras de morte celular distribuídas espaçadamente; por vezes no baço observam-se macrófagos repletos de grânulos de hemozoína derivados da hemólise extra-vascular de eritrócitos

parasitados. Por outro lado, os megalomerontes presentes nos tecidos musculares esquelético e cardíaco tendem a produzir lesões mais evidentes, com estriações hemorrágicas e/ou pálidas, semelhantes às aquelas causadas por *Sarcocystis* sp, correspondentes aos megalomerontes cercados por áreas de necrose, calcificação, hemorragia e infiltrado inflamatório misto. Os megalomerontes têm morfologia variável e não contribuem significativamente para a identificação das espécies parasitárias, ressaltando-se a dificuldade de diferenciar megalomerontes de *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. De todo modo, como enfatizado anteriormente, a pseudo-malária e a leucocitozoonose muito raramente produzem lesões clinicamente importantes (HUFF, 1942; VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008a; FORRESTER; GREINER, 2008).

3.6 CLÍNICA E DIAGNÓSTICO

O diagnóstico com frequência é dificultado pela ausência de sinais clínicos e pela baixa parasitemia nas infecções por *Plasmodium*. Os sinais clínicos e achados de necropsia podem ser sugestivos de infecção, mas o diagnóstico definitivo depende da comprovação da presença do parasita através de esfregaços sanguíneos, provas biomoleculares e/ou histopatologia. O diagnóstico pode ser apoiado pelas técnicas biomoleculares para a identificação da espécie de parasita envolvido, porém isso geralmente fica limitado à pesquisa científica. Outras ferramentas diagnósticas que também estão disponíveis para uso em pesquisa incluem a inoculação em filhotes de pato ou pintinhos para amplificar a parasitemia, o sorodiagnóstico e a imuno-histoquímica.

3.6.1 Sinais clínicos

Os sinais clínicos geralmente estão ausentes nas espécies pouco suscetíveis. Experimentos mais detalhados podem detectar diferenças sutis de longevidade ou de sucesso reprodutivo de aves infectadas por *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*, porém estes resultados tendem a ser inconsistentes e altamente variáveis entre espécies aviárias e contextos ecológicos, e não há sinais detectáveis ao exame clínico veterinário clássico. Perda ou retardo no ganho de peso, claudicação, anemia, prostração, anorexia, sinais neurológicos (desequilíbrio, dificuldade em andar) e penas eriçadas são relatadas em infecções experimentais por *Haemoproteus* em Columbiformes e Galliformes, embora estes sinais sejam tipicamente pouco severos. Em Strigiformes, há relatos de anemia regenerativa severa associada a infecções por *H. syrnii* (ATKINSON; VAN RIPER III, 1991; VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008a).

Nas infecções por *Plasmodium* em espécies de aves altamente suscetíveis, como os pinguins, tipicamente a morte ocorre de forma súbita, sem sinais clínicos *ante-mortem*. Pode ocorrer mortalidade de até 60 a 90% de uma população de pinguins num período de poucas semanas, especialmente na primavera ou verão (quando os pinguins, mantidos em ambientes externos, têm maior probabilidade de entrar em contato com mosquitos infectados). Muitas vezes, as primeiras aves a morrer são justamente aquelas em melhor condição corporal e com boa saúde aparente, ao contrário de outras enfermidades que tenderiam a afetar os animais mais fracos. Quando presentes, os sinais clínicos relatados incluem: convulsão, letargia, anorexia, penas eriçadas, dispneia, mucosas pálidas, diarreia, regurgitação, hipertermia ou hipotermia. Estudos experimentais demonstram ainda que infecções plasmódicas podem levar a diarreia com fezes esverdeadas (excesso de biliverdina associado à hemólise), cuja evolução acompanha diretamente a progressão da parasitemia (ATKINSON; VAN RIPER III, 1991; WILLIAMS, 2005; ATKINSON, 2008b).

Na rotina de reabilitação de pinguins-africanos na *Southern African Foundation for the Conservation of Coastal Birds* (SANCCOB), os sinais clínicos mais frequentemente observados são inespecíficos, tais como letargia, regurgitação, anorexia e ocasionalmente febre (nadadeiras e patas quentes). A ocorrência destes

sinais é considerada particularmente suspeita nos meses de verão. Convulsões em pinguins em boa condição corporal e adequadamente hidratados também são fortemente sugestivos de malária aviária, porém neste estágio a doença já estará muito avançada e a morte é inevitável. Porém, como mencionado anteriormente, com grande frequência as mortes por malária aviária ocorrem sem quaisquer sinais clínicos prévios. Adicionalmente, em pinguins as picadas de mosquitos se concentrarão mais frequentemente nas pálpebras e pele próxima ao bico; a presença de lesões ou vermelhidão nestas áreas pode apontar a possibilidade de exposição à malária aviária (Figura 3.7). A anemia hemolítica regenerativa é um achado frequente durante o pico de parasitemia, porém nem sempre estará presente. A leucocitose por linfocitose é relatada com frequência em pinguins e outras aves. Outros achados laboratoriais podem incluir a elevação de proteína plasmática, redução de albumina e α 2-globulinas, elevação de γ 1/ γ 2-globulinas, elevação de aspartato transaminase, glutamato desidrogenase e gama-glutamil transpeptidase, e redução de creatinina. Embora estes achados sejam relatados em várias espécies, eles são inespecíficos e muitas vezes inconsistentes, sendo ainda menos evidentes em aves com infecções crônicas (WILLIAMS, 2005; ATKINSON, 2008b).

Figura 3.7 - Lesões palpebrais associadas a picadas de mosquitos em pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*)

Fonte: Michael Booth / IFAW

3.6.2 Achados necroscópicos

Aves pouco suscetíveis podem não apresentar qualquer lesão à necropsia nas infecções por *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. Raramente, a infecção por *Haemoproteus* pode resultar em focos de miosite na musculatura torácica ou cardíaca. Infecções fatais por *Leucocytozoon* podem ocasionar esplenomegalia, hepatomegalia, palidez do baço e fígado, sangue aquoso e descorado. Pinguins que vêm a óbito por *Plasmodium* apresentam classicamente um quadro de colapso circulatório, com congestão generalizada da carcaça, acentuadas esplenomegalia e hepatomegalia, intensa congestão e edemas esplênico e pulmonar, congestão hepática e muscular e ingurgitação dos grandes vasos (Figura 3.8). O hidropericárdio, por vezes com volumes de até 60 mL, também é um achado comum e fortemente sugestivo de malária aviária nestas aves. Achados menos frequentes incluem sangue aquoso e descorado, trombos e tromboembolismos (GRINER; SHERIDAN, 1967; FLEISCHMAN et al., 1968a; FIX et al., 1988; ATKINSON; VAN RIPER III, 1991; SCHMIDT et al., 2003; ATKINSON, 2008b).

Figura 3.8 - Achados necroscópicos típicos de malária aviária em pinguins

Fonte: (a) Nola J. Parsons / SANCCOB, (b) Cristiane Kolesnikovas / Associação R3 Animal

Legenda: (a) Hidropericárdio e hepatomegalia em pinguim-africano (*Spheniscus demersus*); (b) esplenomegalia (seta) e congestão generalizada do cadáver em pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*)

3.6.3 Esfregaço delgado

O esfregaço delgado é a técnica clássica de diagnóstico de hemosporidianos aviários. Uma gota de sangue é colhida através de seringa ou microcapilar e o esfregaço delgado é preparado e seco em temperatura ambiente por alguns minutos. Preferencialmente deve-se utilizar sangue fresco ou heparinizado, uma vez que sangue em EDTA tende a apresentar células deformadas ou descoradas. Uma vez seca, a lâmina deve ser fixada em metanol absoluto por 15-30 segundos, e seca em temperatura ambiente. Os esfregaços fixados em metanol podem ser estocados por alguns dias (à sombra e em temperaturas frescas), mas preferencialmente devem ser corados em um período inferior a uma semana; após duas semanas ou mais a coloração não será tão boa e tenderá a ficar ciano-azulada. Os esfregaços podem ser corados segundo a técnica de Giemsa, Wright-Rosenfeld, Diff-Quick, Wright, Wright modificado, entre outras. A leitura da lâmina é feita sob magnificação de 500x ou 1000x (objetivas de imersão), e recomenda-se que 20.000 a 30.000 eritrócitos (aproximadamente 100 a 150 campos sob magnificação 1000x) sejam examinados antes de declarar um animal negativo. Em alguns casos poderá haver uma correlação direta entre as intensidades das lesões necroscópicas e da parasitemia. O esfregaço espesso, preconizado para o diagnóstico de malária em mamíferos, não deve ser utilizado para as aves devido à sobreposição dos núcleos dos eritrócitos (HAWKEY; DENNETT, 1989; VALKIŪNAS, 2005; GARAMSZEGI, 2010).

A identificação das espécies de hemosporidianos ao esfregaço delgado é complexa e requer extenso treinamento; recomendamos a consulta de Valkiūnas (2005) para esta finalidade. *Haemoproteus* e *Plasmodium* apresentam o maior desafio na diferenciação, dadas suas semelhanças morfológicas. Uma característica particular de *Haemoproteus* e *Plasmodium* é que suas formas eritrocitárias adultas, merontes eritrocitários e gametócitos, fazem o acúmulo intracelular de pigmento malárico (hemozoína), a partir da degradação da hemoglobina; estes grânulos de pigmento mostram-se refringentes à microscopia de luz polarizada, auxiliando a sua identificação (Figura 3.9).

Figura 3.9 - Refringência dos grânulos de hemozoína à microscopia de luz polarizada

Fonte: Vanstreels e Zwarg (2014)

Legenda: (a) *Plasmodium* sp, (b) *Haemoproteus* sp, (1) sob luz não-polarizada, (2) sob luz polarizada

A presença de merontes eritrocíticos é um achado característico da infecção por *Plasmodium*; porém sua ausência não é suficiente para excluir a presença deste agente, nem sua presença é suficiente para excluir a possibilidade de uma infecção mista por *Plasmodium* e *Haemoproteus* (Figuras 3.10 e 3.11). Em infecções crônicas, a baixa parasitemia poderá impossibilitar a identificação morfológica da espécie. Além disso, infecções mistas por duas ou mais espécies de *Plasmodium* (ou *Haemoproteus*) não são incomuns, dificultando o diagnóstico morfológico. É importante notar, ainda, que em alguns casos a mesma espécie de hemosporidiano pode apresentar morfologia marcadamente diferente, dependendo da ave infectada. Para fins de pesquisa científica, as técnicas biomoleculares como o sequenciamento genético são necessárias, em combinação à caracterização morfológica, para determinar a(s) espécie(s) de hemosporidiano(s) e identificar com segurança a ocorrência de infecções mistas ou crônicas (FALLON et al., 2003; VALKIŪNAS, 2005; VALKIŪNAS et al., 2006, 2008; BENSCH et al., 2009).

Figura 3.10 - *Plasmodium* spp. em esfregaços sanguíneos delgados de pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) (Giemsa)

Fonte: Vanstreels (2014)

Legenda: (a) trofozoíto inicial de *P. tejerai*, (b) trofozoíto avançado de *P. tejerai*, (c,d) merontes eritrocíticos de *P. tejerai*, (e) macrogametócito de *P. tejerai*, (f) microgametócito de *P. tejerai*. (g) macrogametócito de *P. elongatum*, (h) microgametócito de *P. elongatum*

Figura 3.11 - *Haemoproteus* sp em esfregaço sanguíneo delgado de corujinha-do-mato (*Megascops choliba*) (Rosenfeld)

Fonte: Vanstreels e Zwarg (2014)

Legenda: (a) trofozoíto jovem, (b) trofozoíto avançado, (c) macrogametócito, (d) microgametócito

Leucocytozoon possui características morfológicas particulares (Figura 3.12), ocupando não apenas eritrócitos, no quais exibe morfologia arredondada, mas também leucócitos, nos quais apresenta aspecto alongado e fusiforme. A proporção de gametócitos arredondados e fusiformes flutua ao longo do curso da infecção, sendo que

num período inicial há ampla predominância de formas arredondadas (8-14 dias), enquanto as formas fusiformes surgem mais tardiamente (12-18 dias). Arredondados ou fusiformes, os gametócitos são grandes e deformam completamente a célula hospedeira, sendo prontamente identificáveis em suas formas masculinas (microgametócitos) e femininas (macrogametócitos). Muitas vezes, no entanto, as formas parasitárias de *Leucocytozoon* serão relativamente frágeis e sofrerão ruptura e distorção durante a elaboração do esfregaço delgado, sobretudo os microgametócitos, criando figuras atípicas que podem ser facilmente confundidas com artefatos e/ou debris celulares (Figura 3.13) (VALKIŪNAS, 2005; FORRESTER; GREINER, 2008).

Figura 3.12 - *Leucocytozoon tawaki* em esfregaço sanguíneo delgado de pinguim-Africano (*Spheniscus demersus*) (Diff-Quick)

Fonte: Vanstreels e Parsons (2014)

Legenda: (a) macrogametócito arredondado, (b) microgametócito arredondado, (c) macrogametócito parcialmente distorcido, (d) microgametócito parcialmente distorcido

Babesia é um hemoparasita que pode ser confundido com hemosporidianos (Figura 3.14), sendo que, em especial, suas formas arredondadas assemelham-se aos trofozoítos iniciais de *Haemoproteus* e *Plasmodium*; a diferenciação pode ser feita pela ausência de grânulos de pigmento malárico e pela presença de formas parasitárias

alongadas típicas de *Babesia*, com os merozoítos formando desenhos característicos de quatro extremidades projetando-se em cruz ou em guarda-chuva. Outros hemoparasitas aviários, como *Aegyptianella* sp, *Atoxoplasma* sp, *Ehrlichia* sp, *Hepatozoon* sp, *Borrelia* sp e outros apresentam morfologia distinta e podem ser diferenciados dos hemosporidianos com relativa facilidade, porém artefatos e cristais de hemoglobina podem ser confundidos com trofozoítos e outras formas parasitárias (Figura 3.13) (HAWKEY; DENNET, 1989; PEIRCE, 2000; VALKIŪNAS, 2005).

Figura 3.13 - Exemplos de artefatos e sujidades que podem assemelhar-se a hemoparasitas em esfregaços sanguíneos delgados

Fonte: Vanstreels (2014)

Figura 3.14 - *Babesia peircei* em esfregaço sanguíneo delgado de pinguim-Africano (*Spheniscus demersus*) (Diff-Quick)

Fonte: Vanstreels e Parsons (2014)

Legenda: (a,b) formas esféricas, (c,d) formas alongadas, com quatro merozoítos

3.6.4 Histopatologia

A histopatologia viabiliza o diagnóstico *post-mortem* das hemosporidioses, e é a única técnica que permite determinar se o óbito decorreu ou não desta infecção. A técnica baseia-se no exame microscópico de secções histológicas de tecidos fixados em formalina. Os tecidos são colhidos de carcaças frescas o mais rápido possível após a morte. Se a necropsia não puder ser realizada imediatamente após a morte, a carcaça deve ser mantida em refrigeração (4-8 °C) por um máximo de 24-48 h. O congelamento de carcaças é contraindicado por inviabilizar o adequado exame histopatológico. Fragmentos de todos os órgãos e tecidos, especialmente pulmão, fígado, baço, rim, encéfalo e medula óssea, com 1-2 cm³ ou menores, devem ser colocados em formol tamponado 10%, em uma proporção de 10 volumes de formalina para cada volume de tecidos. O frasco deve ser mantido bem fechado e em temperatura ambiente; uma vez fixadas, as amostras podem ser armazenadas por vários meses ou anos. Porém, com vistas a preservar as amostras para exames imuno-histoquímicos e/ou moleculares futuros, recomenda-se o emblocamento em parafina o mais rápido possível. Colorações histoquímicas diversas podem ser utilizadas para aumentar a probabilidade de detecção das formas parasitárias teciduais (como Tomlinson-Grocott, Richard, Thomas, Wilson-Fairchild e Luna), embora a coloração clássica de Hematoxilina-Eosina seja suficiente na maioria dos casos (LUNA, 1992; SCHMIDT et al., 2003).

O diagnóstico é dado pela visualização de merontes teciduais em macrófagos, miofibroblastos e células endoteliais de baço, pulmão, fígado, musculatura cardíaca, rim, medula óssea e outros tecidos (Figura 3.15). Os merontes teciduais de *Plasmodium* são tipicamente pequenos (5-20 µm) e compostos por uma estrutura cística com dezenas a centenas de pequenas estruturas basofílicas arredondadas (~1 µm), os merozoítos. Tipicamente os merontes apresentarão pouca reação inflamatória na sua periferia imediata, porém no caso de pinguins as lesões poderão ser severas: congestão e edema pulmonar, esplênico e hepático, pneumonia granulocítica multifocal ou difusa, esplenite difusa e por vezes necrótica, e hepatite multifocal ou difusa. É importante notar que ocasionalmente os merontes teciduais podem ser raros e muito

difíceis de evidenciar, enquanto as lesões teciduais são difusas e severas. Além disso, a visualização de eritrócitos parasitados, muitas vezes em marginação no endotélio vascular, também pode apoiar o diagnóstico de infecção plasmódica, particularmente em tecidos que têm baixa incidência de merontes (*p.e.* encéfalo). Neste sentido, o uso de microscopia de luz polarizada pode ser de grande utilidade na detecção dos eritrócitos infectados através da refringência dos grânulos de hemozoína dos parasitas (FLEISCHMAN et al., 1968a; FIX et al., 1988; ATKINSON, 2008b).

No caso de *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*, pode-se observar os megalomerontes em células endoteliais de tecidos diversos, em especial na musculatura esquelética e cardíaca. Os megalomerontes compartilham as características descritas para os merontes teciduais de *Plasmodium*, porém são consideravelmente maiores (50-500 μm) e contêm vários milhares de merozoítos; suas paredes podem ser espessas ou delgadas (HUFF, 1942; ATKINSON, 2008a; FORRESTER; GREINER, 2008).

Figura 3.15 - Meronte tecidual de *Plasmodium* sp em corte histológico de baço de pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) (Hematoxilina-Eosina)

Fonte: Vanstreels (2014)

Nota: A área tracejada foi magnificada duas vezes no detalhe

3.6.5 Decalques teciduais

Os decalques teciduais podem ser utilizados para detectar merontes teciduais no baço, fígado, pulmões e rins, porém há uma elevada frequência de falsos negativos. Para seu preparo, corta-se um pequeno fragmento de baço, fígado, pulmão ou rim, seca-se o excesso de sangue em papel filtro, e a seguir a superfície do tecido é suavemente pressionada contra a superfície de uma lâmina de microscópio, de modo a deixar uma monocamada de células aderida à lâmina. O decalque é seco à temperatura ambiente, fixado em metanol e corado do mesmo modo que o recomendado para esfregaços sanguíneos delgados. Seu exame buscará a presença de merontes teciduais aderidos à superfície da lâmina (Figura 3.16) (FIX et al., 1988; VALKIŪNAS, 2005).

Figura 3.16 - Merontes teciduais de *Plasmodium* sp em decalque tecidual de rim de pinguim-Africano (*Spheniscus demersus*) (Diff-Quick)

Fonte: Vanstreels e Parsons (2014)

Legenda: (a) meronte jovem, (b) meronte avançado

3.6.6 Diagnóstico molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem ganhado destaque no diagnóstico das hemosporidioses, sobretudo na pesquisa científica. A técnica pode ser aplicada

tanto a amostras de sangue de aves vivas (sangue total, coágulo ou papa de hemácias; conservados por congelamento, papel filtro, EasyBlood® ou etanol absoluto) quanto a amostras de tecidos de aves mortas (baço, fígado, pulmão, medula óssea; conservados por congelamento ou etanol absoluto). Aceita-se de modo geral que esta técnica teria uma sensibilidade diagnóstica consideravelmente mais elevada que o esfregaço delgado, ou seja, maior capacidade de detectar hemosporidianos em parasitemia baixa, particularmente em infecções crônicas. No entanto, há considerável discussão sobre a ocorrência de reações cruzadas com outros protozoários, a ocorrência de falsos negativos para algumas espécies, e a ocorrência de falsos positivos por contaminação laboratorial ou amplificação inespecífica. Deste modo, o procedimento mais aceito é o uso combinado do esfregaço delgado e da PCR para um diagnóstico mais seguro. Existem duas abordagens principais para a PCR, podendo ser baseadas em RNA ribossomal ou em DNA mitocondrial; não há consenso sobre qual delas é mais recomendável, embora alguns autores argumentem que as técnicas voltadas ao DNA mitocondrial tendam a ser mais confiáveis para fins diagnósticos. Devido às similaridades genéticas entre esses hemosporidianos, não se conhecem atualmente técnicas de PCR que permitam diferenciar com segurança as infecções por *Haemoproteus* e por *Plasmodium*, e também há um risco de reações cruzadas com *Leucocytozoon*. Por este motivo, para fins de pesquisa preconiza-se o sequenciamento genético, como uma etapa subsequente à PCR, para garantir a identificação da espécie de hemosporidiano envolvido, comparando-se as sequências genéticas com aquelas depositadas em bancos de dados como o GeneBank ou o MalAvi (RICKLEFS; FALLON, 2002; HELLGREN et al., 2004; VALKIŪNAS et al., 2006, 2008b; BENSCH et al., 2009).

3.6.7 Inoculação experimental

A inoculação experimental de filhotes de pato ou pintinhos de um dia foi preconizada por muito tempo para identificar e estudar infecções por *Plasmodium*. Como *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* não produzem merontes eritrocíticos, esta

técnica só pode ser utilizada para detectar *Plasmodium*. Utiliza-se sangue fresco colhido com anticoagulantes, em inoculação subcutânea ou intravenosa; após um período pré-patente variável, as aves inoculadas ampliam a infecção para uma maior parasitemia, facilitando o diagnóstico através de esfregaço delgado e garantindo uma melhor caracterização morfológica das formas eritrocíticas. Atualmente a inoculação experimental não é mais utilizada de forma rotineira, mas ainda pode ser aplicada para a pesquisa científica ou para esclarecer casos ambíguos às outras provas diagnósticas. Amostras com elevada parasitemia podem ser armazenadas em glicerina ou dimetil-sulfóxido e congeladas em nitrogênio líquido, de modo a manterem-se preservadas para inoculações posteriores (CRANFIELD et al., 1994; VALKIŪNAS, 2005).

3.6.8 Outras técnicas diagnósticas

Testes rápidos (testes de lactato desidrogenase) utilizados para o diagnóstico de malária humana podem ser usados para identificar a malária aviária em pinguins. Estes testes utilizam anticorpos contra a enzima lactato desidrogenase de *Plasmodium*, e apresentam uma fita colorida quando uma gota de sangue positiva é colocada no aplicador. Estes testes são utilizados rotineiramente por alguns zoológicos e aquários, porém a experiência da SANCCOB tem mostrado que são necessárias parasitemias muito elevadas são necessárias para produzir resultados positivos, de modo que há um grande número de falsos negativos.

A imuno-histoquímica utilizando anticorpos marcados para *Plasmodium* de origem mamífera pode ser utilizada para esta finalidade, porém é necessária a adequada padronização da técnica antes de sua aplicação. Provas soro-diagnósticas, como o teste imuno-enzimático indireto (ELISA indireto), já foram desenvolvidas com sucesso para detectar anticorpos contra *Haemoproteus* e *Plasmodium* em canários e pinguins para fins experimentais, porém não estão disponíveis para o diagnóstico de rotina e não servem para diferenciar as infecções ativas das infecções anteriores. A técnica de *Quantitative Buffy Coat* foi testada para diagnosticar a infecção plasmódica

em pinguins, mas produziu resultados ambíguos e pouco promissores (GRACZYK et al., 1994b; CRANFIELD, 2003).

3.7 PREVENÇÃO

Como os hemosporidianos aviários são geralmente prevalentes e enzoóticos na avifauna nativa das áreas circundantes dos zoológicos e centros de reabilitação, é inviável visar a erradicação destes parasitas na instituição. É mais razoável considerar que a circulação destes parasitas no ambiente é inevitável e traz poucos impactos negativos às aves nativas. Neste sentido, sempre que um inseto infectado neste ciclo natural de infecção se alimentar de uma ave altamente suscetível, como um pinguim, o risco de exposição existirá e, portanto, as estratégias de melhor custo-benefício para a prevenção das hemosporidioses aviárias nestas aves consistem em interromper o contato entre estas e os insetos hematófagos. Vários métodos preventivos serão discutidos a seguir, e o controle efetivo geralmente dependerá de uma combinação de várias destas estratégias.

3.7.1 Telas anti-mosquitos

Telas anti-mosquitos podem ajudar a reduzir a incidência das hemosporidioses. No entanto, é difícil obter telas suficientemente estreitas devido ao pequeno tamanho dos insetos transmissores, particularmente no caso de *Haemoproteus* e *Plasmodium*. Testes em laboratório demonstraram que os mosquitos podem atravessar com relativa facilidade a maioria das telas anti-mosquitos comercialmente disponíveis. Telas impregnadas com inseticidas podem ter eficácia muito superior, porém são consideravelmente mais caras, devem ser trocadas com regularidade (em geral uma ou duas vezes ao ano) e protegidas da luz solar direta para manterem-se eficazes (ANDRADE; CABRINI, 2010). Além disso, é importante considerar que na prática é

difícil manter uma tela completamente livre de frestas e buracos, requerendo uma instalação muito cuidadosa e inspeções periódicas. Na SANCCOB, a instalação de telas de 2 milímetros cobrindo todas as instalações de reabilitação de aves foi essencial para reduzir dramaticamente a ocorrência de casos de malária aviária (Figura 3.17). Embora neste caso a tela utilizada não seja à prova de mosquitos, ela é uma barreira física que diminui consideravelmente o número de mosquitos que entram nas instalações; telas mais estreitas e efetivamente à prova de mosquitos, além de muito caras, bloqueiam excessivamente a luz solar.

Figura 3.17 - Instalação de telas anti-mosquito para a prevenção da malária aviária em espécies altamente suscetíveis

Fonte: Southern African Foundation for the Conservation of Coastal Birds (SANCCOB)

3.7.2 Ventiladores

Ventiladores também podem ser ferramentas úteis para o controle das hemosporidioses, pois o vento tem grande eficácia em dispersar a pluma de gás carbônico produzida pela respiração das aves e utilizada pelas fêmeas de mosquitos para identificar suas fontes de alimentação. Além disso, o vento interfere com a capacidade de vôo dos insetos, particularmente dos pequenos. Estudos em laboratório e em campo indicam que mesmo ventos fracos, de 1 a 2 m/s, são suficientes para dificultar a habilidade dos mosquitos em encontrarem suas presas (HOFFMANN; MILLER, 2003). Neste sentido, a instalação de ventiladores, em potência baixa a moderada, em pontos diversos dos recintos e voltados aos animais poderia ajudar a prevenir as infecções por hemosporidianos. No entanto, é preciso lembrar que a constante exposição ao vento pode não ser adequada para aves em reabilitação, particularmente para aves debilitadas ou petrolizadas que tenham dificuldade em manter-se aquecidas.

3.7.3 Repelentes

Muitos repelentes de mosquitos estão disponíveis, e podem ser utilizados rotineiramente para limitar os mosquitos pousando nas aves. Nos pinguins, a maioria das picadas de mosquito ocorre nas áreas deplumadas em torno dos olhos e repelentes tipo *roll-on* podem ser aplicados em pequena quantidade nas penas da parte superior da cabeça. Esta prática, valendo-se de DEET (dietil toluamida), tem sido empregada com sucesso pela SANCCOB (Figura 3.18). Devem-se utilizar apenas produtos cuja composição não interfira com a impermeabilização das penas, e seu emprego deve considerar a possibilidade de ocorrerem efeitos negativos aos animais, tais como intoxicações, irritações de mucosa e alterações comportamentais.

Outros repelentes, como armadilhas de luz ultravioleta, repelentes de pastilha ou vaporizadores, repelentes ultra-sônicos, plantas naturalmente repelentes (como

Eucalyptus e *Pelargonium*) e produtos de *Citronella* podem ser utilizados, porém há poucas informações sobre a eficácia real destes produtos, e seu uso deve considerar cuidadosamente a possibilidade de interferência com a saúde e comportamento das aves.

Figura 3.18 - Uso de repelentes de mosquito tipo roll-on aplicados à cabeça de pinguins como estratégia para prevenir a malária aviária

Fonte: Southern African Foundation for the Conservation of Coastal Birds (SANCCOB)

3.7.4 Profilaxia medicamentosa

Uma estratégia frequentemente adotada por zoológicos na América do Norte e Europa é a terapia profilática, através do oferecimento diário de primaquina 1 a 1.25 mg/kg por via oral, através de comprimidos em peixe, durante toda a primavera e verão para todos os pinguins mantidos ao ar livre. Esta profilaxia não evita que episódios de morbidade ou mortalidade ocorram, mas reduz sua frequência e

severidade. Outra alternativa que tem sido utilizada por zoológicos na América do Norte envolve o oferecimento diário de sulfadiazina 125 mg/animal e pirimetamina 4 mg/animal por via oral, também através de comprimidos em peixe durante toda a primavera e verão. Protocolos alternativos utilizando a cloroquina (5 mg/kg, via oral, diariamente) tem sido aplicados empiricamente, porém com eficácia menor. Há pouca informação sobre o uso deste protocolo ou outros para prevenir infecções de hemosporidianos em outras espécies aviárias, tampouco se sabe se as dosagens deveriam ser diferentes entre espécies de pinguins. Aplicações preventivas de primaquina (0.01 mg por ave, dose única, via subcutânea) foram utilizadas com sucesso em experimentos com chapins-azuis (*Parus caeruleus*, massa corpórea ~10 g) para reduzir a intensidade de parasitemia por *Haemoproteus* e a prevalência de *Leucocytozoon*, porém estudos mais detalhados nesta área não foram conduzidos. Em rapinantes, a profilaxia medicamentosa com doses semanais de cloroquina (7 - 25 mg/kg, via oral) e primaquina (1 - 1.3 mg/kg, via oral) têm sido utilizadas. De modo geral, a profilaxia medicamentosa é iniciada um mês antes da temporada de mosquitos e encerrada um mês depois de seu término. Considerando que altas doses de primaquina por longos períodos podem causar lesões hepáticas, embora isto não pareça ocorrer significativamente em pinguins, o oferecimento de suplementos multivitamínicos pode ser indicado (STOSKOPF; BEIER, 1979; FIX et al., 1988; CRANFIELD et al., 1994; MERINO et al., 2000; CRANFIELD, 2003; REMPLE, 2004).

A dificuldade de obtenção da primaquina, no entanto, tem limitado a aplicabilidade desta profilaxia para animais mantidos no Brasil, e os protocolos baseados unicamente em cloroquina têm sido utilizados. Por outro lado, a SANCCOB opta por não utilizar a profilaxia medicamentosa devido à possibilidade de induzir resistência às drogas e de mascaramento de infecções, além não ser factível no tratamento de grandes números de pinguins em reabilitação durante o verão.

3.7.5 Monitoramento com esfregaços delgados

Considerando a frequente ausência de qualquer sinal clínico que permita o diagnóstico precoce da enfermidade nas espécies sensíveis, preconiza-se a realização de esfregaços delgados periódicos para detectar a parasitemia precocemente. Se viável, a colheita de sangue semanal para realização de esfregaços delgados é recomendável em pinguins submetidos à reabilitação, assim como após quaisquer casos de morte súbita com achados necroscópicos compatíveis com malária aviária. Outras técnicas diagnósticas como testes rápidos de malária também têm sido usados em zoológicos e aquários.

3.7.6 Vacinação

Vacinas de DNA contra antígenos de *P. gallinaceum* e *P. relictum* foram desenvolvidas com sucesso para canários e pinguins-Africanos. Estas vacinas mostraram-se eficazes em reduzir a parasitemia e mortalidade em aves naturalmente expostas à infecção plasmódica, porém ofereciam imunidade protetora por um período de apenas um ano, requerendo vacinações atuais. Este protocolo de vacinação foi testado na SANCCOB, porém mostrou baixa eficácia na prevenção das infecções. Estas vacinas não estão mais comercialmente disponíveis nos Estados Unidos da América ou em outros países. No Maryland Zoo (Baltimore, EUA), considerou-se mais efetivo monitorar com esfregaços delgados os pinguins em seu primeiro ano de vida e tratar quaisquer animais parasitêmicos, permitindo à ave desenvolver imunidade ativa ao plasmódio que os protegerá nos anos subsequentes (GRIM et al., 2004).

3.8 TRATAMENTO

Na maioria dos casos não se preconiza medicação para as infecções por *Haemoproteus* ou *Leucocytozoon*, enquanto que para *Plasmodium* o tratamento é preconizado se houver relevância clínica (espécies suscetíveis, aves debilitadas, alta parasitemia, sinais clínicos evidentes). O tratamento tipicamente envolve a combinação de uma droga contra as formas parasitárias teciduais (primaquina) e outra contra as formas parasitárias sanguíneas (cloroquina, derivados da quinina, trimetoprim-sulfa, ou outros) (Quadro 3.3).

Quadro 3.3 - Protocolos terapêuticos para hemosporidioses aviárias

		Droga	Dosagem	Posologia
<i>Plasmodium</i>	Pinguins	Cloroquina	10 mg/kg VO	Dose de ataque, q6h apenas no 1º dia
		Cloroquina	5 mg/kg VO	q24h a partir do 2º dia, por 10 dias
		Primaquina	1 mg/kg VO	q24h a partir do 2º dia, por 10 dias
		Trimetoprim-sulfa	40 mg/kg VO	Opcional, q24h a partir do 11º dia, por 10 dias
	Rapinantes	Cloroquina	20-25 mg/kg VO/IV	Dose de ataque, dose única na hora zero
		Primaquina	0.75-1.3 mg/kg VO	Dose de ataque, dose única na hora zero
		Cloroquina	15 mg/kg VO	Três doses (12h, 24h, 48h)
<i>Leucocytozoon</i>	Rapinantes	Trimetoprim	6 mg/kg IM	q24h, por 7 dias
		Sulfametoxazol	30 mg/kg IM	q24h, por 7 dias
<i>Haemoproteus</i>	Rapinantes	Cloroquina	25 mg/kg VO	Dose de ataque, dose única na hora zero
		Primaquina	0.75 mg/kg VO	Dose de ataque, dose única na hora zero
		Cloroquina	15 mg/kg VO	q24h, por 7 dias
	Rapinantes	Cloroquina	60 mg/kg VO	q24h, por 7-10 dias
		Mefloquina	50 mg/kg VO	q24h, por 7-10 dias

Fonte: Cranfield (2003), Remple (2004), AZA (2005) e Silveira et al. (2013), adaptação de Vanstreels (2014)

Antes de optar por um tratamento, é importante considerar se a influência negativa do estresse resultante da contenção e manuseio dos animais, uma vez que a maioria dos protocolos requer múltiplas contenções físicas para a administração das drogas. Nestes casos, colocar as aves em gaiola com alta saturação de oxigênio por

20-30 minutos antes dos procedimentos e utilizar anestesia inalatória superficial pode ajudar a minimizar a interferência do estresse na eficácia do tratamento.

Para pinguins, o protocolo clássico de cloroquina e primaquina estende-se por 10 dias e, para aves que persistem parasitêmicas, pode-se acrescentar mais dez dias de tratamento com trimetoprim-sulfa. No Brasil, em virtude de um controle rigoroso na aquisição e uso da primaquina, a maioria das instituições não tem logrado aplicar este tratamento, de modo que muitas vezes o protocolo é aplicado unicamente com cloroquina, que é menos efetivo, mas reduz a mortalidade. Para aves de rapina, doses mais elevadas têm sido utilizadas empiricamente e a dose de ataque de cloroquina pode ser administrada por via intravenosa nos casos graves (STOSKOPF; BEIER, 1979; FIX et al., 1988; REMPLE, 2004). Notar que há uma distinção entre as concentrações da droga comercializada e a droga-base (100 mg de cloroquina contém 66 mg de cloroquina base ativa; 100 mg de primaquina contém 57 mg de primaquina base ativa), e as dosagens aqui mencionadas referem-se à droga base ativa.

Há numerosos relatos de tratamentos com drogas antimaláricas (sobretudo pirimetamina e mefloquina, mas também quinina, quinacrina, plasmoquina, doxiciclina, atebriana, melarsomina, buparvaquone, entre outros), com protocolos adaptados a partir daqueles utilizados em medicina humana ou veterinária, porém esta terapêutica ainda não está bem estabelecida nem sua eficácia foi investigada (AZA, 2005). É importante ter em mente que todos estes protocolos ainda são relativamente anecdotaís e empíricos, e para poucos deles foram feitos ajustes sistemáticos de dosagem ou de testes com drogas mais efetivas. Deste modo, tentativas clínicas com drogas ou dosagens diferentes podem produzir piores ou melhores resultados, devendo ser aplicadas com cuidado e sob monitoramento veterinário intensivo.

Os tratamentos medicamentosos não apresentam sucesso completo, reduzindo a morbidade e mortalidade, mas não as eliminando. Também foi demonstrado que o tratamento não elimina formas teciduais quiescentes, de modo que episódios posteriores de estresse ou tratamento com corticosteróides poderão ser acompanhados de recrudescências, porém tipicamente menos severas que a infecção inicial. Portanto, recomenda-se fazer controles periódicos com esfregaço sanguíneo e, se possível, diagnóstico molecular nos animais sobreviventes, retomando o tratamento em animais que voltem a ser positivos (CRANFIELD et al., 1994; CRANFIELD, 2003).

REFERÊNCIAS

ANDRADE, C. F. S.; CABRINI, I. Comparative studies on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* adult females trespassing commercial nets. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 26, n. 1, p. 112-115, 2010.

ATKINSON, C. T.; VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: LOYE, J. E.; ZUK, M. **Bird-parasite interactions: ecology, evolution and behaviour**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 19-48.

ATKINSON, C. T.; DUSEK, R. J.; LEASE, J. K. Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 1, p. 20-27, 2001.

ATKINSON, C. T. *Haemoproteus*. In: ATKINSON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. **Parasitic diseases of wild birds**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008a. p. 13-34

ATKINSON, C. T. Avian Malaria. In: ATKINSON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. **Parasitic diseases of wild birds**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008b. p. 35-53.

AZA. AMERICAN ZOO AND AQUARIUM ASSOCIATION. **Penguin husbandry manual**. 2005. Disponível em: <http://aviansag.org/Husbandry/Unlocked/Care_Manuals/Penguin_HB.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2009.

BAK, Ung-Bok; PARK, Jae-Chan; LIM, Young-Jae. An outbreak of malaria in penguins at the Farm-land Zoo. **Korean Journal of Parasitology**, v. 22, n. 2, p. 267-272, 1984.

BENNETT, G. F.; BISHOP, M. A.; PEIRCE, M. A. Checklist of the avian species of *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 (Apicomplexa) and their distribution by avian family and Wallacean life zones. **Systematic Parasitology**, v. 26, p. 171-179, 1993.

BENNING, T. L.; LAPOINTE, D.; ATKINSON, C. T.; VITOUSEK, P. M. Interactions of climate change with biological invasions and land use in the Hawaiian Islands: modeling the fate of endemic birds using a geographic information system. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 99, p. 14246-14249, 2002.

BENSCH, S.; HELLGREN, O.; PÉREZ-TRIS, J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. **Molecular Ecology Research**, v. 9, p. 1353-1358, 2009.

CRANFIELD, M. R.; GRACZYK, T. K.; BEALL, F. B.; IALEGGIO, D. M.; SHAW, M. L.; SKJOLDAGER, M. L. Subclinical avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) and induction of parasite recrudescence. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, n. 3, p. 372-376, 1994.

CRANFIELD, M. R. Sphenisciformes (Penguins). In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Fowler's zoo and wild animal medicine**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2003. p. 103-110.

DINHOPL, N.; MOSTEGL, M. M.; RICHTER, B.; NEDOROST, N.; MADERNER, A.; FRAGNER, K.; WEISSENBOCK, H. Application of in-situ hybridization for the detection and identification of avian malaria parasites in paraffin wax-embedded tissues from captive penguins. **Avian Pathology**, v. 40, n. 3, p. 315-320, 2011.

FALLON, S. M.; RICKLEFS, R. E.; SWANSON, B. L.; BERMINGHAM, E. Detecting avian malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 5, p. 1044-1047, 2003.

FIX, A. S.; WATERHOUSE, C.; GREINER, E. C.; STOSKOPF, M. K. *Plasmodium relictum* as a cause of avian malaria in wild-caught Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 4, p. 610-619, 1988.

FLEISCHMAN, R. W.; SQUIRE, R. A.; SLADEN, W. J. L.; MELBY Jr., E. C. Malaria (*Plasmodium elongatum*) in captive African penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 153, n. 7, p. 928-935, 1968.

FORRESTER, D. J.; GREINER, E. C. Leucocytozoonosis. In: ATKINSON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. **Parasitic diseases of wild birds**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. p. 54-107.

GABALDÓN, A.; ULLOA, G.; ZERPA, N. *Fallisia (Plasmodioides) neotropicalis* subgen. nov. sp.nov. from Venezuela. **Parasitology**, v. 90, p. 217-225, 1985.

GARAMSZEGI, L. Z. The sensitivity of microscopy and PCR-based detection methods affecting estimates of prevalence of blood parasites in birds. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1197-1203, 2010.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; McCUTCHAN, T. F.; BICKNESE, E. J. Characteristics of naturally acquired avian malaria infections in naive juvenile African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Parasitological Research**, v. 80, p. 634-637, 1994a.

GRACZYK, T. D.; CRANFIELD, M. R.; SKJOLDAGER, M. L.; SHAW, M. L. An ELISA for detecting Anti-*Plasmodium* spp. antibodies in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 1, p. 60-66, 1994b.

GRIM, K. C.; van der MERWE, E.; SULLIVAN, M.; PARSONS, N.; MCCUTCHAN, T. F.; CRANFIELD, M. *Plasmodium juxtanucleare* associated with mortality in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 34, n. 3, p. 250-255, 2003.

GRIM, K. C.; McCUTCHAN, T.; LI, Jun; SULLIVAN, M.; GRACZYK, T. K.; McCONKEY, G.; CRANFIELD, M. Preliminary results of an anticircumsporozoite DNA vaccine trial for protection against avian malaria in captive African Black-footed penguins. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, n. 2, p. 154-161, 2004.

GRINER, L. A.; SHERIDAN, B. W. Malaria (*Plasmodium relictum*) in penguins at the San Diego Zoo. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 1, p. 7-17, 1967.

HACKETT, S. J.; KIMBALL, R. T.; REDDY, S.; BOWIE, R. C. K.; BRAUN, E. L.; BRAUN, M. J.; CHOJNOWSKI, J. L.; COX, W. A.; HAN, Kin-Lan, HARSHMAN, J.; HUDDLESTON, C. J.; MARKS, B. D.; MIGLIA, K. J.; MOORE, W. S.; SHELDON, F. H.; STEADMAN, D. W.; WITT, C. C.; YURI, T. A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. **Science**, v. 320, p. 1763-1768, 2008.

HAWKEY, C. M.; DENNETT, T. B. **A colour atlas of comparative veterinary haematology**. Ipswich: Wolfe Publishing, 1989. 192 p.

HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 797-802, 2004.

HELLGREN, O.; PÉREZ-TRIS, J.; BENSCH, S. A jack-of-all-trades and still a master of some: Prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites. **Ecology**, v. 90, n. 10, p. 2840-2849, 2009.

HOFFMANN, E. J.; MILLER, J. R. Reassessment of the role and utility of wind in suppression of mosquito (Diptera: Culicidae) host finding: stimulus dilution supported over flight limitation. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 5, p. 607-614, 2003.

HUFF, C. G. Schizogony and gametocyte development in *Leucocytozoon simondi*, and comparisons with *Plasmodium* and *Haemoproteus*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 71, n. 1, p. 18-32, 1942.

LEVIN, I. I.; VALKIŪNAS, G.; SANTIAGO-ALARCON, D.; CRUZ, L. L.; IEZHOVA, T. A.; O'BRIEN, S. L.; HAILER, F.; DEARBORN, D.; SHCREIBER, E. A.; FLEISCHER, R. C.; RICKLEFS, R. E.; PARKER, P. G. Hippoboscids-transmitted *Haemoproteus* parasites (Haemosporida) infect Galapagos Pelecaniform birds: Evidence from molecular and morphological studies, with a description of *Haemoproteus iwa*. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 1019-1027, 2011.

LEVIN, I. I.; VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; O'BRIEN, S. L.; PARKER, P. G. Novel *Haemoproteus* species (Haemosporida: Haemoproteidae) from the swallow-tailed gull (Lariidae), with remarks on the host range of Hippoboscids-transmitted avian hemoproteids. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 4, p. 847-854, 2012.

LUNA, L. G. **Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts**. Gaithersburg: American Histolabs, 1992. 767 p.

PEIRCE, M. A. A taxonomic review of avian piroplasms of the genus *Babesia* Starcovici, 1893. **Journal of Natural History**, v. 34, p. 317-332, 2000.

PEIRCE, M. A.; PRINCE, P. A. *Hepatozoon albatrossi* sp. nov. (Eucoccidia: Hepatozoidae) from *Diomedea* spp. in the Antarctic. **Journal of Natural History**, v. 14, n. 3, p. 447-452, 1980.

PÉREZ-TRIS, J.; HASSELQUIST, D.; HELLGREN, O.; KRIZANAUSKIENE, A.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. What are malaria parasites? **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 5, p. 209-211, 2005.

REMPLE, J. D. Intracellular Hematozoa of raptors: a review and update. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 18, p. 75-88, 2004.

RICKLEFS, R. E.; FALLON, S. M. Diversification and host switching in avian malaria parasites. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 269, p. 885-892, 2002.

RODHAIN, J. L'infection a *Plasmodium relictum* chez les pingouins. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 27, n. 2, p. 139-157, 1939.

SCHMIDT, R. E.; REAVILL, D. R.; PHALEN, D. N. **Pathology of pet and aviary birds**. Ames: Blackwell Publishing, 2003. 234 p.

SILVA-FILHO, R. P.; RUOPPOLO, V. Sphenisciformes. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens – medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 309-323.

SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; LACORTE, G. A.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; VANSTREELS, R. E. T.; STEINDEL, M.; CATÃO-DIAS, J. L.; VALKIŪNAS, G.; BRAGA, É. M. Parasitological and new molecular-phylogenetic characterization of the malaria parasite *Plasmodium tejerai* in South American penguins. **Parasitology International**, v. 62, p. 165-171, 2013.

SONI, J. L.; COX, H. W. Pathogenesis of acute avian malaria: I. Immunologic reactions associated with anemia, splenomegaly, and nephritis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 23, n. 4, p. 577-585, 1974.

SONI, J. L.; COX, H. W. Pathogenesis of acute avian malaria: II. Anemia mediated by a cold-active autohemagglutinin from the blood of chickens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 2, p. 206-213, 1975a.

SONI, J. L.; COX, H. W. Pathogenesis of acute avian malaria: III. Antigen and antibody complexes as a mediator of anemia in acute *Plasmodium gallinaceum* infections of chickens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 3, p. 423-430, 1975b.

SONI, J. L.; COX, H. W. Pathogenesis of acute avian malaria: IV. Immunologic factors in nephritis of acute *Plasmodium gallinaceum* infections of chickens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 3, p. 431-438, 1975c.

STOSKOPF, M. K.; BEIER, J. Avian malaria in African black-footed penguins. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 175, n. 9, p. 944-947, 1979.

VALKIŪNAS, G.; BENSCH, S.; IEZHOVA, T. A.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; HELLGREN, O.; BOLSHAKOV, C. V. Nested cytochrome B polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 418-422, 2006.

VALKIŪNAS, G.; ATKINSON, C. T.; BENSCH, S.; SEHGAL, R. N. M.; RICKLEFS, R. E. Parasite misidentifications in GenBank: how to minimize their number? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 6, p. 247-248, 2008.

VALKIŪNAS, G. **Avian malaria parasites and other haemosporidia**. Boca Raton: CRC Press, 2005. 932 p.

VAN RIPER III, C.; VAN RIPER, S. G.; GOFF, M. L.; LAIRD, M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. **Ecological Monographs**, v. 56, n. 4, p. 327-344, 1986.

WILLIAMS, R. B. Avian malaria: clinical and chemical pathology of *Plasmodium gallinaceum* in the domesticated fowl *Gallus gallus*. **Avian Pathology**, v. 34, p. 29-47, 2005.

4 INTRACELLULAR BLOOD PARASITES OF PENGUINS: A CRITICAL REVIEW AND META-ANALYSIS

4.1 ABSTRACT

Blood parasites are among the most significant pathogens for captive and wild penguins. Four genera of intracellular hemoparasites have been reported in penguins: *Babesia*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* and *Plasmodium*. We compile and critically review the published records of such parasites in penguins, discussing the distribution among penguin species and invertebrate hosts, epidemiology and pathology. By juxtaposing the geographic distribution of penguin breeding colonies, records of blood parasites in penguins, their suspected invertebrate hosts, and the sampling effort of published studies, we provide insight on the current gaps of knowledge and the potential for novel records in the future. Finally, considering the distribution, epidemiology and pathology of these parasites, we conclude by discussing their potential as conservation threats for wild penguins.

4.2 INTRODUCTION

Penguins are susceptible to a broad variety of infectious pathogens, among which blood parasites are particular significant (CLARKE; KERRY, 1993; JONES; SHELLAM, 1999a,b; DUIGNAN, 2001). The following genera of intracellular blood parasites have been reported in penguins: *Plasmodium* (SCOTT, 1927), *Leucocytozoon* (FALLIS et al., 1976), *Babesia* (EARLÉ et al., 1992), and *Haemoproteus* (LEVIN et al., 2009). In particular, great concern has been raised on the impact of protozoan diseases such as avian malaria (*Plasmodium*) and leucocytozoonosis (*Leucocytozoon*) on the health and survival of wild penguins (FANTHAM; PORTER, 1944; LEVIN et al., 2009; HILL et al., 2010; ARGILLA et al., 2013). Extracellular blood parasites of penguins include *Borrelia*

(COLES, 1941; YABSLEY et al., 2012), *Trypanosoma* (JONES; WOEHLE, 1989) and Onchocercidae microfilariae (MERKEL et al., 2007; SIERS et al., 2010), which will not be discussed here.

In this review we examine the published information on blood parasites of penguins, as well as studies that attempted to detect them or that could have incidentally done so (studies examining blood smears or histopathology with other aims but could have detected blood parasites if they were present). Only records provided in official institutional reports, theses, extended abstracts and peer-reviewed publications are considered. We adopt the current taxonomy of penguins as accepted by IUCN (2014), and the geographic distribution of penguin breeding colonies as compiled by Williams (1995); DSEWPC (2012); Fretwell et al. (2012) and García-Borboroglu and Boersma (2013). Geographic information systems were used to contrast the distribution of records of blood parasites in penguins with that of the invertebrate hosts known to transmit them, including: soft ticks (*Argas* spp., *Carios* spp.) (DIETRICH et al., 2011), hard ticks (*Amblyomma loculosum*, *Ixodes* spp.) (BARBOSA et al., 2011; DIETRICH et al., 2011), biting midges (*Culicoides* spp.) (MURRAY, 1975; SPINELLI; MARTINEZ, 1991; TABACHNICK, 2004; AYBAR et al., 2010), black flies (*Austrosimulium* spp., *Cnephia* spp., *Prosimulium* spp., *Simulium* spp.) (DUMBLETON, 1963; HILL et al., 2010; ARGILLA et al., 2013) and mosquitoes (*Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*) (WHITE, 1989).

Figure 4.1 presents the distribution of blood parasite genera among penguin species and lists the scientific and common names of penguins. Figure 4.2A represents the geographic location of studies and reports of blood parasites in penguins, and figure 4.2B illustrates the geographic distribution of sampling effort of studies on blood parasites of penguins. Figure 4.3 represents the juxtaposition of the distribution of the reports of blood parasites in penguins and their suspected or confirmed invertebrate hosts. Figure 4.4 compares the latitudinal distribution of penguin colonies (adapted from ANCEL et al., 2013) and that of the sampling effort of studies on blood parasites of penguins.

Appendix A summarizes the records and/or studies on blood parasites in penguins. A number of studies have employed serological methods to detect antibodies against *Babesia* sp and *Plasmodium* sp in penguins. Because these studies do not

confirm whether the parasite actually developed in the host, we will not address them in detail but only summarize them in appendix B.

Figure 4.1 - Host distribution of intracellular blood parasites among penguin species

	<i>Babesia</i>	<i>Haemoproteus</i>	<i>Leucocytozoon</i>	<i>Plasmodium</i>	Undetermined parasites
<i>Aptenodytes forsteri</i> (Emperor)					
<i>Aptenodytes patagonicus</i> (King)				C	
<i>Eudyptes chrysocome</i> (Southern rockhopper)				C	
<i>Eudyptes chrysolophus</i> (Macaroni)			C	C	
<i>Eudyptes moseleyi</i> (Northern rockhopper)				W,C	
<i>Eudyptes pachyrhynchus</i> (Fiordland)			W,R		
<i>Eudyptes robustus</i> (Snares)				W	
<i>Eudyptes schlegeli</i> (Royal)					
<i>Eudyptes sclateri</i> (Erect-crested)					
<i>Eudyptula minor</i> (Little)	W		E	W,C	W
<i>Megadyptes antipodes</i> (Yellow-eyed)			W	W	W
<i>Pygoscelis adeliae</i> (Adélie)					
<i>Pygoscelis antarcticus</i> (Chinstrap)				C	
<i>Pygoscelis papua</i> (Gentoo)				C	
<i>Spheniscus demersus</i> (African)	W,R		W	W,C,R	
<i>Spheniscus humboldti</i> (Humboldt)				C,R	
<i>Spheniscus magellanicus</i> (Magellanic)		R		C,R	
<i>Spheniscus mendiculus</i> (Galapagos)		W		W	

Note: Records were classified according to the context in which the diagnosis was established: wild penguins (W), penguins undergoing rehabilitation (R), penguins captive in zoos and aquaria (C), penguins infected in experimental conditions (E)

Figure 4.2 - Geographic distribution of records of intracellular blood parasites in penguins (A) and of the sampling effort of studies investigating blood parasites in wild penguins (B). Blue areas correspond to the distribution of penguin breeding colonies

Source: Vanstreels (2014)

Figure 4.2 - Geographic distribution of records of intracellular blood parasites in penguins in relation to their confirmed or presumed invertebrate hosts. Blue areas correspond to the distribution of penguin breeding colonies

Source: Vanstreels (2014)

4.3 *BABESIA* (BABESIOSIS)

Babesia spp. (Piroplasmida: Babesiidae) parasitizes birds and mammals, with 13 avian-infecting species (PEIRCE, 2000, 2005; SCHNITTGER et al., 2012). In the avian blood, these parasites can be found in the cytoplasm of erythrocytes either as round forms (trophozoites and pre-gametocytes) or tetrameric elongated forms (meronts); there are no hemozoin granules. There is no invasion of tissue cells, however these parasites can occasionally be seen in the margin of blood vessels (PEIRCE, 2000; CHAUVIN et al., 2009; SCHNITTGER et al., 2012).

4.3.1 Species recorded in penguins

Only one species, *Babesia peircei*, has been described in penguins (EARLÉ et al., 1993). Coles (1941) observed intraerythrocytic inclusions in the blood smear of an African penguin and speculated it to be *Aegyptianella* sp; this record was later reviewed as *Babesia* sp (BENNETT et al., 1992). It is safe to assume this and other records of *Babesia* sp in penguins correspond to *B. peircei* (PEIRCE, 2000). The remarkable morphological similarity between *B. peircei* and *B. poelea*, a parasite of boobies (*Sula* spp.), has led Peirce (2000) to suggest these taxa are synonymous.

4.3.2 Distribution among penguin hosts

Babesia was reported in African penguins in the wild and in rehabilitation (COLES, 1941; EARLÉ et al., 1993; BROSSY et al., 1999; YABSLEY et al., 2012) and in wild little penguins (CUNNINGHAM et al., 1993).

4.3.3 Invertebrate hosts and geographic distribution

It is generally accepted that hard ticks (Ixodidae) are the most relevant vectors of avian *Babesia* spp., but soft ticks (Argasidae) are thought to play a more significant role for colonial ground-nesting birds (PEIRCE, 2000). Hard ticks, particularly *Ixodes uriae*, are the most probable invertebrate hosts of *B. peircei* to African penguins (EARLÉ et al., 1993; PEIRCE, 2000), but the soft tick *Carios capensis* has also been speculated to play a role (BROSSY et al., 1999). The hard tick *Ixodes kohlsi* may play a key role in the transmission to little penguins at New South Wales, Australia (CUNNINGHAM et al., 1993). Soft and hard seabird ticks are broadly distributed around the world, overlapping with the distribution of penguins in numerous sub-Antarctic islands, South America, South Africa, Australia, New Zealand, Antarctic Peninsula and some locations in the Antarctic mainland (Figure 4.3A); the occurrence of *Babesia* spp. in penguins at these locations is therefore plausible.

4.3.4 Epidemiology and pathology

Cunningham et al. (1993) observed *B. peircei* in 1.6 to 4.8% (blood smears) of wild little penguins at New South Wales, Australia. Brossy (1992) reported *B. peircei* as endemic at low prevalence (blood smears: 4%) in wild African penguins at Namibia and southwestern South Africa, whereas a higher prevalence (blood smears: 11-15%) was observed in African penguins undergoing rehabilitation at Cape Town, South Africa.

The clinical and pathological effects of *B. peircei* are not clear. Infected little penguins can present mild regenerative anemia, but did not show any evident signs of illness (CUNNINGHAM et al., 1993; SERGENT et al., 2004). Brossy et al. (1999) considered that *B. peircei* “does not cause overt clinical symptoms except under stress or in association with other debilitating diseases”. Co-infections by *Babesia* and *Borrelia* occur in approximately 50% of African penguins undergoing rehabilitation in South Africa (YABSLEY et al., 2012), which could indicate: (a) transmission by a shared invertebrate

host, (b) *Babesia* infections predispose penguins or ticks to *Borrelia* infections or vice-versa, or (c) the poor health and immune status of penguins in rehabilitation predispose them to both *Babesia* and *Borrelia*.

4.4 HAEMOPROTEUS (HAEMOPROTEOSIS)

Haemoproteus spp. (Haemosporida: Haemoproteidae) parasitize exclusively birds. There are 143 recognized species, of which 137 in the subgenus *Parahaemoproteus* and 8 in the subgenus *Haemoproteus* (VALKIŪNAS, 2005; LEVIN et al., 2009, 2011, 2012; IEZHOVA et al., 2010, 2011; PARSONS et al., 2010; VALKIŪNAS et al., 2010, 2013; LACORTE et al., 2013). These parasites can be found in the cytoplasm of avian erythrocytes, as trophozoites and gametocytes; hemozoin granules (dark-brown staining pigment) are present, but not erythrocytic meronts. In the avian tissues, these parasites invade endothelial cells and macrophages to form exoerythrocytic meronts; megalomeronts may be developed, which are much larger and thick-walled (HUFF, 1942; PAPERNA; GILL, 2003; VALKIŪNAS, 2005).

4.4.1 Species recorded in penguins

Because these parasites were detected through molecular methods but were not observed in blood smears, *Haemoproteus* sp lineages in penguins are yet unidentified. Phylogenetic analyses indicate however the lineages obtained from Galapagos and Magellanic penguins are distinct, and both belong to the subgenus *Parahaemoproteus* (LEVIN et al., 2009; VANSTREELS et al., in press)¹. The lineage identified in wild Galapagos penguins is closely related to *Haemoproteus* spp. found in passerines,

¹ VANSTREELS, R. E. T.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; SANDRI, S.; SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; FERREIRA-JUNIOR, F. C.; EPIPHANIO, S.; STEINDEL, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in Magellanic penguins undergoing rehabilitation in Southern Brazil. **PLOS One**, in press.

particularly *Haemoproteus coatney* and *Haemoproteus passeris*, whereas the lineage identified in Magellanic penguins undergoing rehabilitation in Brazil is closely related to lineages found in earless owls (*Strix* spp.), particularly *Haemoproteus syrnii* (LEVIN et al., 2009; VANSTREELS et al., in press)². This is surprising considering that *Haemoproteus* spp. are generally considered host-specific to the order level (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008a).

Considering that no parasites were seen in blood smears and that molecular tests may produce false-positive results if DNA of recently-inoculated sporozoites is present in the blood even when infection has not been successfully established (VALKIŪNAS et al., 2009), it is possible that these *Haemoproteus* sp were not truly capable of infecting penguins and instead represent incidental findings. Furthermore, as will be discussed in section “Studies with inconclusive/questionable results”, the report of *Haemoproteus* sp in little penguins provided by Cannell et al. (2013) is, in our opinion, questionable and may requires additional data before it can be considered valid.

4.4.2 Distribution among penguin hosts

DNA from *Haemoproteus* sp has been detected in the blood of Galapagos (LEVIN et al., 2009) and Magellanic penguins (VANSTREELS et al., in press)³. The infection of little penguins (CANNELL et al., 2013) has yet to be confirmed.

^{2,3} VANSTREELS, R. E. T.; KOLESHNIKOVAS, C. K. M.; SANDRI, S.; SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; FERREIRA-JUNIOR, F. C.; EPIPHANIO, S.; STEINDEL, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in Magellanic penguins undergoing rehabilitation in Southern Brazil. **PLOS One**, in press.

4.4.3 Invertebrate hosts and geographic distribution

H. (Parahaemoproteus) spp. are transmitted by biting midges *Culicoides* spp. (Ceratopogonidae) (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008a). Eleven species of *Culicoides* spp. have been associated with the transmission of these parasites (VALKIŪNAS, 2005). *Culicoides pusillus* is the only species of its genus that occurs at the Galapagos Archipelago (SINCLAIR, 2014), whereas a broad variety of species occurs in Brazil (WIRTH; FELIPPE-BAUER, 1989; BORKENT, 2013). It is worth noting that the *Haemoproteus*-positive penguin identified at the Galapagos Archipelago was sampled at western Isabela Island (I.I. Levin, pers. comm.), whereas *C. pusillus* has been recorded only at Santa Cruz Island (SINCLAIR, 2014). Even though DNA from *Haemoproteus* sp was identified in the blood meals of mosquitoes *Aedes taeniorhynchus* at the Galapagos Archipelago (BATAILLE et al., 2012), this was most likely an incidental finding and probably did not correspond to actual infections.

There are no records of *Haemoproteus* in penguins in Peru, Namibia and South Africa, however the distribution of biting midges indicates penguins breeding at those regions might become exposed to these parasites (Figure 4.3B). The same can be said for captive penguins in large areas of South America, Africa, Oceania and southern Europe, Asia and North America.

4.4.4 Epidemiology and pathology

As previously discussed, it is not clear whether *Haemoproteus* sp is actually successful in infecting penguins or if the detection of this parasite merely reflects recent inoculation of sporozoites. In any case, the *Haemoproteus*-positive penguins studied by Levin et al. (2009) and Vanstreels et al. (in press)⁴ had no external signs of disease.

⁴ VANSTREELS, R. E. T.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; SANDRI, S.; SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; FERREIRA-JUNIOR, F. C.; EPIPHANIO, S.; STEINDEL, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in Magellanic penguins undergoing rehabilitation in Southern Brazil. **PLOS One**, in press.

4.5 *LEUCOCYTOZOON* (LEUCOCYTOZOONOSIS)

Leucocytozoon spp. (Haemosporida: Leucocytozoidae) parasitize exclusively birds. There are 36 recognized species, 35 in the subgenus *Leucocytozoon* and one, *Leucocytozoon caulleryi*, in the subgenus *Akiba*. In the avian blood, trophozoites and gametocytes of these parasites can be found in the cytoplasm of erythrocytes and mononuclear leukocytes; there are neither erythrocytic meronts nor hemozoin granules. In the avian tissues, these parasites will invade endothelial cells, macrophages and hepatocytes; megalomeronts may be developed (HUFF, 1942; VALKIŪNAS, 2005).

4.5.1 Species recorded in penguins

Only *Leucocytozoon (Leucocytozoon) tawaki* has been described in penguins (FALLIS et al., 1976), and only in penguins (PEIRCE, 2005; VALKIŪNAS, 2005). The parasite was first described at South Island, New Zealand (FALLIS et al., 1976; ALLISON et al., 1978), and when Earlé et al. (1992) and Peirce et al. (2005) observed similar parasites in penguins in Europe and South Africa they did not hesitate to conclude it corresponded to *L. tawaki* on the basis of the generally similar morphology and the assumption that leucocytozoids are host-specific at the family level.

On the other hand, other authors have observed leucocytozoids in yellow-eyed penguins at several New Zealand islands but preferred not to infer on the species involved (HILL, 2008; HILL et al., 2010; ARGILLA et al., 2013). Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome b gene indicated that these lineages belonged to the subgenus *Leucocytozoon*, and that there might be at least two different phylogenetic clusters of *Leucocytozoon* sp in yellow-eyed penguins: cluster A is limited to Enderby Island and might be more pathogenic than cluster B, which was detected at Enderby, Campbell, South and Stewart Islands (ARGILLA et al., 2013). It is unclear whether these phylogenetic clusters are lineages within the same morphospecies or if they correspond to distinct species.

4.5.2 Distribution among penguin hosts

Leucocytozoon has been identified in Fiordland (FALLIS et al., 1976; ALLISON et al., 1978), yellow-eyed (HILL et al., 2010; ARGILLA et al., 2013), and African penguins (FALLIS et al., 1976; EARLÉ et al., 1992; HILL, 2008) (Table 4.1). Additionally, Macaroni penguins have been found to carry the infection in captivity, but Humboldt penguins in the same collection did not harbour the parasite at the time (PEIRCE et al., 2005). Because it is generally accepted that leucocytozooids are not transmitted among birds of different taxonomic orders (VALKIŪNAS, 2005), it is unlikely that birds other than penguins can serve as reservoirs of infection.

Allison et al. (1978) examined the blood smear of a juvenile little penguin (*Eudyptula minor*) at Jackson Head (South Island, NZ), and it did not observed circulating blood parasites. However, after being forcibly exposed to simuliid flies near *Leucocytozoon*-infected Fiordland penguin chicks at the same location, the little penguin also developed the infection with circulating gametocytes after 10 days, demonstrating that the species is susceptible to the infection. As will be discussed in section “Studies with inconclusive/questionable results”, there is reason to believe that *Leucocytozoon* sp was present in wild little penguins at Penguin Island, Australia (CANNELL et al., 2013), in a captive little penguin at North Island, New Zealand (VARNEY, 2006), and in a wild yellow-eyed penguin at Otago Peninsula, New Zealand (ALLEY et al., 2004).

4.5.3 Invertebrate hosts and geographic distribution

Leucocytozoon (*Leucocytozoon*) spp. are transmitted by black flies (Simuliidae), particularly *Simulium* spp. and *Prosimulium* spp., and also *Cnephia* spp. and *Austrosimulium* spp. (VALKIŪNAS, 2005; FORRESTER; GREINER, 2008).

Cnephia spp., *Simulium* spp. and *Prosimulium* spp. are not present in New Zealand (DUMBLETON, 1963), whereas *Austrosimulium australense*, *A. dumbletoni* and *A. unguatum* are abundant and competent vectors for the transmission of *L. tawaki* to

Fiordland penguins (FALLIS et al., 1976; ALLISON et al., 1978; DESSER; ALLISON, 1979). *A. unguatum* is also very abundant in Stewart and South Islands, New Zealand, where *Leucocytozoon* sp has been found in yellow-eyed penguins (HILL et al., 2010; ARGILLA et al., 2013). On the other hand, *A. campbellense* and *A. vexans* are thought to be responsible for the transmission in the Campbell and Auckland Islands, respectively (ARGILLA et al., 2013). *Austrosimulium* spp. do not occur in South Africa (DUMBLETON, 1963) and thus other simuliid flies must be involved in the transmission of this parasite to African penguins (EARLÉ et al., 1992); *Cnephia* spp. and *Simulium* spp. are present in the region (DUMBLETON, 1963).

In New Zealand, besides Fiordland and yellow-eyed penguins, it is interesting to note that black flies also occur at Snares Islands (Figure 4.3B), where Snares penguins breed, and at Campbell and Auckland Islands, where small numbers of erect-crested penguins (*Eudyptes sclateri*) are present (DAVIS, 2013). Fallis et al. (1976) sampled a small number of Snares and erect-crested penguins at the Snares Islands but found no blood parasites. The distribution of black flies largely overlaps with the distribution of penguins in South America, so it is plausible that *Leucocytozoon* sp infects Humboldt and/or Magellanic penguins. In particular, the humid coast of central and southern Chile might provide adequate environmental conditions for these parasites considering the occurrence of *Austrosimulium* sp, *Simulium* sp and *Cnephia* sp (DUMBLETON, 1963) and as attested by the abundance of *Leucocytozoon* spp. in passerines at the region (MERINO et al., 2008).

4.5.4 Epidemiology and pathology

Leucocytozoon sp prevalence is very high in Fiordland penguins at Jackson Head (South Island) (blood smears: 77-94%) (FALLIS et al., 1976; ALLISON et al., 1978), and much more variable in yellow-eyed penguins (polymerase chain reaction - PCR): 11% at Otago Peninsula and Catlins (South Island), 21% at Campbell Island, 66% at Enderby Island, and 83% at Stewart Island (HILL et al., 2010; ARGILLA et al., 2013).

Infection only occurs after chicks are 3 weeks or older, becoming acute and disseminated in older chicks then progressing to a subclinical chronic infection in adulthood (ALLISON et al., 1978; HILL et al., 2010; ARGILLA et al., 2013). Although prevalence is similar in older chicks and adults (and possibly highest in moulting adults), parasitemia tends to be considerably lower in adults (FALLIS et al., 1976; ALLISON et al., 1978). In fact, parasitemia in adults may be so low as to be undiagnosed or substantially underestimated by blood smears in comparison to molecular methods (HILL et al., 2010; ARGILLA et al., 2013).

Leucocytozoon can be occasionally pathogenic for penguin chicks. One yellow-eyed penguin chick found dead at Enderby Is. (n = 19) and two at Stewart Is. (n = 14) were considered to have died from leucocytozoonosis. Necropsy findings included disseminated petechial and ecchymotic hemorrhages, hepatomegaly, splenomegaly and hydropericardium; megalomeronts were abundant in the liver, spleen, kidneys, lungs and other tissues (HILL et al., 2010; ARGILLA et al., 2013). The tissues of additional seven yellow-eyed penguins were PCR-positive for *Leucocytozoon* sp at Stewart Is., however it was not determined whether leucocytozoonosis was the cause of death or not (HILL et al., 2010). Furthermore, a juvenile Fiordland penguin found at Muriwai beach (North Island, NZ) died during rehabilitation after having been positive to *Leucocytozoon* sp on blood smears, but it was impossible to determine whether leucocytozoonosis was the cause of death (HILL, 2008).

Earlé et al. (1992) found that *Leucocytozoon* sp is uncommon amongst African penguins undergoing rehabilitation (blood smears: 0.75%). It is speculated that the infection also occurs in wild African penguins but, because the positive blood smears examined in that study were prepared between 5 to 24 days after admission to the rehabilitation center, it is impossible to determine whether these results faithfully represent prevalence in the wild. The health effects of the infection in African and Macaroni penguins are not known (EARLÉ et al., 1992; PEIRCE et al., 2005).

4.6 PLASMODIUM (AVIAN MALARIA)

Plasmodium spp. (Haemosporida: Plasmodiidae) are parasites of all vertebrates taxa. More than 60 avian-infecting species have been identified to date, in five subgenera: *Bennettinia*, *Giovannolaia*, *Haemamoeba*, *Huffia* and *Novyella* (VALKIŪNAS, 2005; MARTINSEN; PERKINS, 2013). In the avian blood, these parasites can be found in the cytoplasm of erythroblasts and erythrocytes – and occasionally thrombocytes (SILVEIRA et al., 2009) –, in the form of trophozoites, erythrocytic meronts or gametocytes; hemozoin granules are present. In the avian tissues, these parasites will invade endothelial cells and macrophages; megalomeronts are absent (VALKIŪNAS, 2005).

4.6.1 Species recorded in penguins

Six species have been reported in penguins: *Plasmodium* (*Haemamoeba*) *relictum*, *P.* (*Huffia*) *elongatum*, *P.* (*Bennettinia*) *juxtannucleare*, *P.* (*Haemamoeba*) *tejerai*, *P.* (*Haemamoeba*) *cathemerium* and *P.* (*Novyella*) *nucleophilum*. Early reports refer to *P. praecox* or *P. praecox relictum* (RODHAIN, 1939; RODHAIN; ADRIANNE, 1952; GRÜNBERG; KUTZER, 1963), which were later found to be synonyms of *P. relictum* (VALKIŪNAS, 2005).

P. relictum is generally considered the most relevant species for penguins, having been identified in wild penguins in South Africa, New Zealand and sub-Antarctic islands (FANTHAM; PORTER, 1944; LAIRD, 1950; BROSSY, 1992), and in captive penguins in Europe (RODHAIN, 1939; FANTHAM; PORTER, 1944; RODHAIN; ADRIANNE, 1952; GRÜNBERG; KÜTZER, 1963), North America (GRINER; SHERIDAN, 1967; STOSKOPF; BEIER, 1979; FIX et al., 1988), Hawaii (LAIRD; VAN RIPER, 1981), Eastern Asia (BAK et al., 1984), South Africa (PENRITH et al., 1994) and South America (CARVAJAL; ALVARADO, 2009), and in penguins undergoing rehabilitation in South Africa (BROSSY, 1992; BROSSY et al., 1999). In some reports, however, the

identification of *P. relictum* was based solely on the presence of large round gametocytes and absence of rod-shaped pigment granules and/or no photomicrographs or detailed morphological descriptions were provided (e.g. RODHAIN, 1939; RAETHEL, 1960; STOSKOPF; BEIER, 1979; FIX et al., 1988; CARVAJAL; ALVARADO, 2009). Because *P. relictum* is remarkably pleomorphic and many other species of the subgenus *Haemamoeba* share these characteristics (LAIRD; VAN RIPER, 1981; VALKIŪNAS, 2005), these records should be considered with caution. It is worth noting that the two lineages reported by Bueno et al. (2010) as *P. relictum* were later argued to correspond to *P. elongatum* and *P. (Haemamoeba)* sp closely related to *P. lutzi* (VANSTREELS et al., in press)⁵.

P. elongatum has been reported primarily in penguins captive in North America (HUFF; SHIROISHI, 1962; HERMAN et al., 1974) and, in most cases, outbreaks in North American zoos were associated with both *P. elongatum* and *P. relictum*, sometimes in mixed infections (FLEISCHMAN et al., 1968a,b; HERMAN et al., 1968, 1974; SLADEN et al., 1979; STOSKOPF; BEIER, 1979; BEIER; STOSKOPF, 1980; BEIER; TRPIS, 1981). The species was also reported in penguins in captivity or undergoing rehabilitation in Brazil (VANSTREELS et al., in press, in prep)^{5,6}. *P. elongatum* has been suggested to be less pathogenic to penguins than *P. relictum* (BEIER; STOSKOPF, 1980; GRACZYK et al., 1994a).

P. juxtannucleare was reported by Grim et al. (2003) while examining African penguins undergoing rehabilitation at Cape Town, South Africa. However, this record demands caution. The photomicrographs and description of the parasites are not in accordance with the morphological characteristics of this species, in which fully grown gametocytes should not exceed the size of the nuclei of infected erythrocytes (VALKIŪNAS, 2005). On the other hand, *P. relictum* has been reported at the same facility (BROSSY, 1992; BROSSY et al., 1999) and its gametocytes do exceed the size of the host cell nucleus (VALKIŪNAS, 2005). Grim et al. (2003) identified *P.*

⁵ VANSTREELS, R. E. T.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; SANDRI, S.; SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; FERREIRA-JUNIOR, F. C.; EPIPHANIO, S.; STEINDEL, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in Magellanic penguins undergoing rehabilitation in Southern Brazil. **PLOS One**, in press.

⁶ VANSTREELS, R. E. T.; SILVA-FILHO, R. P.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; MAYORGA, L. F. S. P.; RUOPPOLO, V.; EPIPHANIO, S.; AMAKU, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Epidemiology and pathology of avian malaria in penguins undergoing rehabilitation along the coast of Brazil. In preparation.

juxtannucleare on the basis of high sequence identity in BLAST search, a method shown to be inadequate to identify avian hemosporidians (VALKIŪNAS et al., 2008; VANSTREELS et al., in press)⁷. Because the gene sequences were not deposited in public databases it is impossible to conduct further phylogenetic analyses that might confirm the species identity.

P. tejeraei was reported only in Magellanic penguins undergoing rehabilitation in Brazil (SILVEIRA et al., 2013; VANSTREELS et al., in press, in prep.)^{7,8}, as were *P. cathemerium* and *P. nucleophilum* (VANSTREELS et al., in prep.)⁸. While *P. tejeraei* seems to be highly pathogenic for penguins and seems to be associated with substantial mortality, the other two have been occasionally identified in clinically healthy individuals.

Because a number of studies have not conclusively identified all *Plasmodium* lineages detected (REWELL, 1948; TOLLINI et al., 2000; KO et al., 2008; EJIRI et al., 2009; LEVIN et al., 2009a, 2013; VAN RENSBURG, 2010; VANSTREELS et al., in press, in prep.)^{7,8}, it is probable that many other species of *Plasmodium* have yet to be recorded in penguins. In the case of Van Rensburg (2010) it is possible to determine the species belonged to the subgenus *Haemamoeba* because gametocytes were roundish, oval or irregular, and their size markedly exceeded that of the erythrocyte nuclei. As will be discussed in section “Studies with inconclusive/questionable results”, there is reason to believe that the reports of *Plasmodium* sp provided by Alley et al. (2004) and Varney (2006) are inaccurate.

4.6.2 Distribution among penguin hosts

Thirteen of the 18 penguin species have been shown to be susceptible to *Plasmodium* in the wild or in captivity (Table 4.1). The exceptions include species

⁷ VANSTREELS, R. E. T.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; SANDRI, S.; SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; FERREIRA-JUNIOR, F. C.; EPIPHANIO, S.; STEINDEL, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in Magellanic penguins undergoing rehabilitation in Southern Brazil. **PLOS One**, in press.

⁸ VANSTREELS, R. E. T.; SILVA-FILHO, R. P.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; MAYORGA, L. F. S. P.; RUOPPOLO, V.; EPIPHANIO, S.; AMAKU, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Epidemiology and pathology of avian malaria in penguins undergoing rehabilitation along the coast of Brazil. In preparation.

seldom – if ever – maintained in captivity (Fiordland, Royal, Erect-crested penguins) and Antarctic species that are generally maintained in mosquito-free acclimatized environments (Adélie and Emperor penguins). It is therefore probable that all penguin species are susceptible to *Plasmodium*.

It should be noted that even though Laird (1950) reports to have examined “*E. pachyrhynchus* (drooping-crested penguin) collected at the Snares Islands”, this taxon was later revised and specimens breeding in the Snares Archipelago are currently considered a separate species, the Snares penguin (*Eudyptes robustus*) (OLIVER, 1953). Additionally, some *ex-situ* records refer to rockhopper penguins “*Eudyptes crestatus*” (RAETHEL, 1960; SLADEN et al., 1979; LAIRD; VAN RIPER, 1981), but because this species was later split into two species (*E. chrysocome* and *E. moseleyi*) (JOUVENTIN et al., 2006), it is not always possible to determine to which species the record corresponds. In the case of the Baltimore Zoo (SLADEN et al., 1979), records indicate the penguins had been captured at the Falkland Islands (E. Brown, pers. comm.) and therefore were *E. chrysocome*.

4.6.3 Invertebrate hosts and geographic distribution

It is well established that avian plasmodia are transmitted exclusively by mosquitoes (Culicidae), particularly *Culex* spp., *Mansonia* spp., *Culiseta* spp. and *Aedeomyia* spp.; additionally, *Aedes* spp., *Anopheles* spp. and *Armigeres* spp. can also be competent hosts in experimental conditions (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008b).

Studies in zoos and aquaria indicate that *Culex* spp. play a key role in the transmission of *Plasmodium* sp to captive penguins, particularly *C. pipiens* (RODHAIN, 1939; RAETHEL, 1960; GRÜNBERG; KUTZER, 1963; BEIER; TRPIS, 1981), *C. quinquefasciatus* (= *Culex fatigans*) (LAIRD; VAN RIPER, 1981), *C. tarsalis* (HUFF; SHIROISHI, 1962), *C. restuans* (BEIER; TRPIS, 1981) or *C. (Culex) sp* (BUENO et al., 2010). Fantham and Porter (1944) found *Plasmodium* sp in *C. quinquefasciatus* collected at Saldanha Bay, South Africa, where a wild penguin had been found dead

with a *P. relictum* infection. In New Zealand and in the Galapagos Archipelago, *C. quinquefasciatus*, introduced during human colonization, is thought to be responsible for the introduction of *Plasmodium* sp (TOMPKINS; GLEESON, 2006; LEVIN et al., 2009a; LEVIN; PARKER, 2011). In the case of the Galapagos Archipelago, however, *Aedes taeniorhynchus* still has to be investigated as a potential host, particularly because this species has been recorded in Mexico carrying *Plasmodium* sp lineages similar to those found in Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) (LEVIN et al., 2013).

All *ex-situ* and most *in-situ* records of *Plasmodium* sp in penguins fall within the distribution of *C. pipiens* and *C. quinquefasciatus* (Figure 4.3A). However, a few *in-situ* records are found outside of this distribution and merit further consideration. Even though in New Zealand *C. quinquefasciatus* is restricted to the North Island (WHITE, 1989; HOLDER, 1999), *C. pervigilans* has been suspected to be responsible for the transmission of *Plasmodium* sp in the South Islands and other New Zealand islands (HOLDER, 1999; STURROCK; TOMPKINS, 2008), and could explain the records of *Plasmodium* sp in yellow-eyed penguins at Foveaux Strait and Campbell Island (FANTHAM; PORTER, 1944; LAIRD, 1950) and in Snares penguins at Snares Island (LAIRD, 1950). *Ochlerotatus* (= *Aedes*) *australis* is an invasive species at those locations (HOLDER, 1999; SNELL, 2005) and could also play a role in the transmission.

The record of *P. relictum* in a Northern rockhopper penguins at Gough Island provided by Fantham and Porter (1944) is surprising because this is an extremely remote island in which there are no mosquitoes (GASTON et al., 2003). The only neighboring archipelago, Tristan da Cunha, is also mosquito-free (MEDLOCK et al., 2010). Two hypotheses can be proposed to explain this unusual record: (a) infection was acquired while roaming elsewhere, possibly near the coast of South Africa, or (b) a yet unrecorded mosquito host is present in the islands. Based on the morphological description and illustrations, the record unequivocally corresponds to *Plasmodium* (*Haemamoeba*) sp. Because the five individuals examined by Fantham and Porter (1944) are the only wild Northern rockhopper penguins ever examined for blood parasites, additional studies will be important to clarify the record.

Falkland, South Georgia, Marion and Macquarie Islands are reportedly free from mosquitoes (LAIRD, 1952; HÄNEL et al., 1998; MEDLOCK et al., 2010) and the climate of South Georgia, South Sandwich, Bouvet, Amsterdam, Saint Paul, Crozet, Kerguelen

and Peter I Islands is considered too adverse for mosquitoes (MEDLOCK et al., 2010). It is therefore reasonable to assume that there is no *Plasmodium* sp transmission in those locations, even if there have been little to no studies on blood parasites of penguins. The same can be said for Antarctica, Antarctica and the South Shetland Islands, where all studies have failed to identify *Plasmodium* sp in penguins.

On the other hand, the lack of reports of *Plasmodium* sp in wild penguins along the coast of Peru and Chile likely reflects the insufficiency of studies, as the coast west to the Andes provides adequate environment for mosquitoes (MITCHELL; DARSIE, 1985; WHITE, 1989; WRBU, 2014). Although it is unclear whether infection occurred in the wild or in captivity, the occurrence of avian malaria in Magellanic penguins undergoing rehabilitation at Valdivia, Chile (CARVAJAL; ALVARADO, 2009) demonstrates the adequate environmental conditions for the transmission of avian malarial parasites in the region. In fact, *Plasmodium* sp has been reported in passerines as far south as Navarrino Island (54°56'S) (MERINO et al., 2008). To the east of the Andes, *Aedes albifasciatus* and *Culex pipiens* are present in Chubut and Santa Cruz provinces of Argentina, however climate and environmental conditions are generally adverse and mosquitoes occur very scarcely (MITCHELL; DARSIE, 1985; WHITE, 1989; WRBU, 2014).

4.6.4 Epidemiology and pathology

It is well established that avian malaria outbreaks in zoos and aquaria result from local mosquitoes inoculating penguins with *Plasmodium* sp acquired from the native birds in the surrounding of the penguin exhibit (BEIER; TRPIS, 1981; LAIRD; VAN RIPER, 1981; CRANFIELD et al., 1994; GRACZYK et al., 1994a; EJIRI et al., 2009; BUENO et al., 2010). Because mosquito abundance is markedly seasonal, cases of avian malaria in captive penguins tend to concentrate in spring-summer, particularly late summer (GRÜNBERG; KUTZER, 1963; GRINER; SHERIDAN, 1967; SLADEN et al.,

1979; BEIER; STOSKOPF, 1980; VANSTREELS et al., in prep.)⁹. Mosquitoes are most active in penguin exhibits at night (BEIER; TRPIS, 1981). Whenever investigated at zoos that recorded avian malaria outbreaks, the prevalence of *Plasmodium* in mosquitoes near penguin exhibits is low (<1%) (BEIER; TRPIS, 1981; BUENO et al., 2010). Similarly, Fantham and Porter (1944) found *Plasmodium* sp in 2% of *C. quinquefasciatus* collected at Saldanha Bay, South Africa, where *P. relictum* was found to infect wild penguins.

Outbreaks of avian malaria tend to occur relatively suddenly and/or in successive waves. Mortality might depend on the species/lineage involved, whether there was prior exposure to *Plasmodium* sp, and on the administration of drug treatment, with as many as 10% to 83% penguins dying within a few weeks or months (FLEISCHMAN et al., 1968a; STOSKOPF; BEIER, 1979; FIX et al., 1988; CRANFIELD et al., 1994; GRACZYK et al., 1994a; BUENO et al., 2010; VANSTREELS et al., in press)¹⁰.

A similar epidemiological pattern has been observed in penguins undergoing rehabilitation. At a rehabilitation center in Cape Town, South Africa, avian malaria accounted for 19-29% of the deaths of African penguins, particularly during summer. A considerable fraction of the penguins were already *Plasmodium*-positive upon admission (30-35%), suggesting that avian malaria may play a role in debilitating penguins in the wild which in turn resulted in them being brought to rehabilitation centers. Avian malaria was more frequent in oiled penguins than in those not oiled, and most penguins that died as a result of the infection were juveniles. *Plasmodium*-positive penguins stayed 70% longer in rehabilitation, presumably because avian malaria is a debilitating condition that delays rehabilitation. Surprisingly, however, penguins that were diagnosed with *Plasmodium* sp at some point during rehabilitation had similar release rates than those in which the parasite was never detected (PARSONS; UNDERHILL, 2005). In Magellanic penguins, on the other hand, approximately 10% of the specimens deceased during rehabilitation in Brazil were *Plasmodium*-positive. Unlike their African

⁹ VANSTREELS, R. E. T.; SILVA-FILHO, R. P.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; MAYORGA, L. F. S. P.; RUOPPOLO, V.; EPIPHANIO, S.; AMAKU, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Epidemiology and pathology of avian malaria in penguins undergoing rehabilitation along the coast of Brazil. In preparation.

¹⁰ VANSTREELS, R. E. T.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; SANDRI, S.; SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; FERREIRA-JUNIOR, F. C.; EPIPHANIO, S.; STEINDEL, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in Magellanic penguins undergoing rehabilitation in Southern Brazil. **PLOS One**, in press.

counterparts, Magellanic penguins are thought to be *Plasmodium*-free on admission and become infected during rehabilitation. Individuals that are not oiled and maintained throughout summer being most at risk, and *Plasmodium*-positive individuals had a mortality rate 44% higher than those *Plasmodium*-negative (VANSTREELS et al., in prep.)¹¹.

In wild penguins, *Plasmodium* has been detected with highly variable prevalence. *Plasmodium* sp infections were detected in the blood smears of 0.7% of African penguins at Dyer Island, 3% of African penguins at Saldanha Bay, South Africa, 10% of yellow-eyed penguin at Foveaux Strait, New Zealand, one of two yellow-eyed penguins at Campbell Island, 10.7% of Snares penguins at Snares Island, and one of five Northern rockhopper penguin at Gough Island (FANTHAM; PORTER, 1944; LAIRD, 1950; BROSSY, 1992). Using molecular methods, Levin et al. (2009, 2013) detected *Plasmodium* in the blood of 5.4% of Galapagos penguins, with prevalence varying between 2.1% and 42.9% among islands.

None of the wild penguins in which *Plasmodium* sp was detected had external signs of disease, and parasitemia was relatively low or undetectable in blood smears (FANTHAM; PORTER, 1944; LAIRD, 1950; BROSSY, 1992; LEVIN et al., 2009, 2013). There are unconfirmed reports of wild little penguins suspected to have died from avian malaria (AWHR, 2001), and tissue meronts compatible with *Plasmodium* sp were observed in the liver and spleen of three deceased wild little penguin chicks (VAN RENSBURG, 2010). Fantham and Porter (1944) detected *Plasmodium* sp in a deceased wild African penguin however, because the penguin had multiple traumatic lesions, it was not clear to what extent avian malaria may have contributed to its death.

Most penguins with avian malaria in captivity are in good body condition and do not present clinical signs, dying suddenly; when clinical signs are present, they are not specific and may include: anorexia, depression, lethargy, weakness, regurgitation, green feces, hyperthermia, pale mucosa, and dyspnea (RODHAIN, 1939; GRINER; SHERIDAN, 1967; SLADEN et al., 1979; STOSKOPF; BEIER, 1979; BAK et al., 1984;

¹¹ VANSTREELS, R. E. T.; SILVA-FILHO, R. P.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; MAYORGA, L. F. S. P.; RUOPPOLO, V.; EPIPHANIO, S.; AMAKU, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Epidemiology and pathology of avian malaria in penguins undergoing rehabilitation along the coast of Brazil. In preparation.

FIX et al., 1988; VANSTREELS et al., in press)¹². Hematology may reveal leukocytosis with lymphocytosis and/or monocytosis (STOSKOPF; BEIER, 1979; FIX et al., 1988; GRACZYK et al., 1994a; VANSTREELS et al., in press)¹². Infected penguins often have low parasitemia (<2%) (STOSKOPF; BEIER, 1979; GRACZYK et al., 1994a), however occasionally much higher parasitemia may be observed, with up to 80% of erythrocytes parasitized and multiple parasites per erythrocyte (FANTHAM; PORTER, 1944; BUENO et al., 2010; VANSTREELS et al., in press)¹².

Captive penguins deceased from avian malaria typically present hepatomegaly, splenomegaly, lung congestion and hydropericardium (RODHAIN, 1939; BAK et al., 1984; FIX et al., 1988; GRACZYK et al., 1994a; GRIM et al., 2003; KO et al., 2008; CARVAJAL; ALVARADO, 2009). Tissue meronts are present in multiple tissues and concentrate especially in the lungs, kidneys, brain, heart, liver and spleen (RODHAIN, 1939; FLEISCHMAN et al., 1968b; BAK et al., 1984; FIX et al., 1988; GRACZYK et al., 1994a; GRIM et al., 2003; KO et al., 2008; SILVEIRA et al., 2013; VANSTREELS et al., in press, in prep.)^{12,13}. Concurrent diseases are not uncommon, and aspergillosis is frequently reported in captive penguins deceased from avian malaria (SCOTT, 1927; RODHAIN, 1939; REWELL, 1948; GRÜNBERG; KUTZER, 1963; GRINER; SHERIDAN, 1967; SLADEN et al., 1979; FIX et al., 1988; CARVAJAL; ALVARADO, 2009; VANSTREELS et al., in prep.)¹³. Septicemia (GRÜNBERG; KUTZER, 1963), enteritis/diarrhea (SCOTT, 1927; FIX et al., 1988), infestation with gastrointestinal helminthes (RODHAIN; ANDRIANNE, 1952; FIX et al., 1988; VANSTREELS et al., in prep.)¹³, clostridiosis (PENRITH et al., 1994), babesiosis (YABSLEY et al., 2012) and lung or liver helminthes (VANSTREELS et al., in prep.)¹³ have also been recorded concurrently with avian malaria.

¹² VANSTREELS, R. E. T.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; SANDRI, S.; SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; FERREIRA-JUNIOR, F. C.; EPIPHANIO, S.; STEINDEL, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in Magellanic penguins undergoing rehabilitation in Southern Brazil. **PLOS One**, in press.

¹³ VANSTREELS, R. E. T.; SILVA-FILHO, R. P.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; MAYORGA, L. F. S. P.; RUOPPOLO, V.; EPIPHANIO, S.; AMAKU, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Epidemiology and pathology of avian malaria in penguins undergoing rehabilitation along the coast of Brazil. In preparation.

4.7 STUDIES WITH INCONCLUSIVE/QUESTIONABLE RESULTS

A few published reports of blood parasites in penguins require particular consideration, as their results were inconclusive or may be interpreted differently. It is well established that only *Leucocytozoon* spp. invade hepatocytes to form tissue meronts, whereas *Haemoproteus* spp. and *Plasmodium* spp. do not invade hepatocytes but only endothelial cells and macrophages (ATKINSON; VAN RIPER III, 1991; VALKIŪNAS, 2005). The preliminary records provided by Alley et al. (2004) and Varney (2006) in wild yellow-eyed penguins at Otago Peninsula (South Island, New Zealand) and captive little penguins at North Island (New Zealand) respectively are therefore more compatible with *Leucocytozoon* sp and not to *Plasmodium* sp as originally proposed; because these records are not detailed nor peer-reviewed we prefer not to consider them in the current analysis.

Cannell et al. (2013) described the finding of *Haemoproteus* sp as the cause of death of ten little penguins found dead on Penguin Island, Western Australia. However, because they report that the parasites were present intracellularly in hepatocytes, their histopathological findings are compatible with *Leucocytozoon* sp and there is a possibility of co-infection or misdiagnosis. Furthermore, the nested PCR test had a very high false negative rate (60%) and very poor repeatability. This might be explained by the choice of an unusual combination of primers, which would be unable to produce a proper nested amplification (HaemNF-HaemNR2 followed by HaemNFI-HaemNR3; see BENSCH et al., 2009) and an increased number of thermal cycles in the HaemNFI/HaemNR3 reaction (35 cycles instead of 20). As a result, non-specific amplification and/or co-amplification of other parasites may have occurred (see COSGROVE et al., 2006; SZÖLLŐSI et al., 2008). The early trophozoites observed in erythrocytes are compatible with either *Babesia* sp, *Haemoproteus* sp, *Leucocytozoon* sp or *Plasmodium* sp, and therefore do not contribute to species identification. The authors did identify cytochrome b gene sequences that corroborate the presence of *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) sp. However, no information is provided on the gene sequence of the *Haemoproteus* sp positive control to dismiss the possibility of a laboratory contamination, which is not uncommon when using nested PCR methods. For

example, while using nested PCR methods to detect blood parasites in little penguins in New Zealand, Van Rensburg (2010) reported that 9 out of 10 positive results had to be discarded as false positives due to positive control contaminations. The cases reported by Cannell et al. (2013) therefore, in our opinion, require further investigation to clarify the identity of the parasite and to determine whether misdiagnosis or co-infection by other blood parasites – particularly *Leucocytozoon* sp – may have occurred; until then, we believe it is more judicious to consider this blood parasite as an undetermined species.

Van Rensburg (2010) observed *Babesia*-like round intraerythrocytic inclusions in the blood smears of 11% of wild little penguins sampled at Tiritiri Matangi Island, Cook Strait, New Zealand (n = 79). Molecular analyses would be welcome to confirm the identity of these parasites, as even though little penguins are known to be susceptible to *Babesia* sp (CUNNINGHAM et al., 1993) there is no record of this parasite in New Zealand. Because small round forms are also observed in early stages of *Haemoproteus* sp, *Leucocytozoon* sp and *Plasmodium* sp, these parasites must also be considered.

McDonald (2012) attempted to detect *Plasmodium* sp in wild yellow-eyed penguins at Otago Peninsula, South Island, New Zealand, however obtained inconclusive results. No parasites were observed in blood smears. While using a PCR test targeting a rRNA gene, all samples were positive with clear electrophoretic bands of the expected size. When the same samples were tested using a PCR test targeting the TRAP gene, only a faint electrophoretic bands with sizes inconsistent with the expected were produced. When another group of samples were subjected to a third PCR test, weak electrophoretic bands were produced in 30% of the samples. Because primer sets originally designed to be specific to avian plasmodia have been shown to occasionally cross-amplify *Leucocytozoon* spp. (COSGROVE et al., 2006; SZÖLLŐSI et al., 2008), it is possible that the results obtained by McDonald (2012) resulted from *Leucocytozoon* infection. This is further corroborated by the fact that Argilla et al. (2013) documented a relatively high prevalence of *Leucocytozoon* sp in South Island, including at Otago Peninsula. Even so, the interference by other apicomplexan parasites should be considered, particularly *Babesia* sp.

4.8 CONSIDERATIONS ON STUDY METHODS AND FUTURE STUDIES

In total, approximately 6000 penguins have been examined to date for blood parasites, a relatively small number when compared for example to virological surveys in birds (OLSEN et al., 2006; HANSON et al., 2008). Substantial sampling effort has been directed towards temperate and sub-Antarctic regions, between 30°S and 60°S, which is consistent with the concentration of penguin populations in these latitudes (Figure 4.4). However, there is a conspicuous lack of studies examining blood parasites of penguins between 10°S and 30°S, which corresponds to breeding colonies of Humboldt penguins in Peru and northern Chile and African penguins in Namibia. Considering the occurrence of potential invertebrate hosts (Figure 4.3), future investigations at those regions are likely to detect blood parasites. Similarly, populations of penguins in the southern coast of Chile are possibly exposed to blood parasites transmitted by mosquitoes and black flies, and penguins at several sub-Antarctic islands and in the Antarctic Peninsula could be exposed to tick-borne blood parasites.

Figure 4.4 - Latitudinal distribution of breeding penguins (gray bars, lower axis) and penguins sampling effort of studies investigating blood parasites in wild penguins through different diagnostic methods (colored bars, upper axis)

Approximately 75% of the penguins evaluated for blood parasites to date were tested solely through morphological methods, predominantly blood smears but also histopathology, tissue impression smears and scanning electron microscopy. Miller et al. (2001) were the first to employ PCR for the diagnosis of blood parasites in penguins and, since then, an increasing number of studies have been employed molecular methods. Molecular methods (standard or nested PCR, *in-situ* hybridization, cloning, gene sequencing) are considered highly sensitive diagnostic methods and provide the most accurate estimates of parasite prevalence, even more so when low parasitemia and/or low prevalence are thought to occur (RICHARD et al., 2002; GARAMSZEGI, 2010; DINOHPL et al., 2011). However, these methods require *a priori* definition of the species/genus to be investigated, and have been demonstrated to produce both false negatives and positives and perform poorly in identifying mixed infections (FREED; CANN, 2003, 2006; COSGROVE et al., 2006; VALKIŪNAS et al., 2006, 2008; SZÖLLŐSI et al., 2008). Despite the development of more sensitive molecular methods, blood smears are still valuable because of their low cost and requirements in terms of field equipment and logistics. Furthermore, blood smears do not require prior determination of the blood parasites to be searched for and allowing for the detection and morphological characterization of all parasite genera herein described (PEIRCE, 2005; VALKIŪNAS, 2005; VALKIŪNAS et al., 2006). As a result, the best strategy currently available is the combination of both morphological and molecular methods, which allows for the best sensitivity while combining the morphological and phylogenetic analysis to identify the parasite species.

Serological methods have also been employed to study blood parasites in penguins, particularly *Plasmodium* sp (Appendix B). However, there is marked discrepancy between the high seroprevalence and the low prevalence of *Plasmodium* indicated by direct diagnostic tests in the same populations, which some authors have interpreted as an indication of possible inaccuracy of the serological assays (STURROCK; TOMPKINS, 2007; McDONALD, 2012). In particular, the possibility of cross-reactivity between antibodies against *Leucocytozoon* and helminthes with the *Plasmodium* antigens used in serological assays remains to be evaluated, as these parasites are abundant at locations where discrepantly high seroprevalence was observed (i.e. New Zealand and Galápagos Is.). Possible alternatives strategies to

improve the specificity of serodiagnostic assays for penguins include the adaptation of an immunoblot assay developed for passerines (ATKINSON et al., 2000), the development of indirect immunofluorescence tests (HOOGESTEYN; CUNNINGHAM, 1996), or the use of monoclonal antibodies against penguin IgG (but not IgM or other proteins of the penguin serum) as secondary antibodies for the ELISA test (see SAMSON, 1986).

4.9 IMPLICATIONS FOR CONSERVATION

The conservation significance of *B. peircei* is not clear, and epidemiological, clinical and pathological studies will be important to clarify their potential impacts on the health and fitness of wild penguins (EARLÉ et al., 1993). The current evidence suggests *Haemoproteus* spp. pose minor or no threat to penguin conservation, however this is a parasite occasionally reported to be pathogenic (DONOVAN et al., 2008). On the other hand, *Leucocytozoon* and *Plasmodium* have been clearly established as potentially threatening to the conservation of these birds.

Plasmodium is recognized as a conservation-threatening pathogens due to its well-documented impacts on the avifauna of Hawaii where, in association with other environmental impacts, its introduction led to dramatic population decreases – and in some cases extinction – of Hawaiian honeycreepers (VAN RIPER III et al., 1986; ATKINSON; LAPOINTE, 2009). The high susceptibility of honeycreepers and penguins is thought to result from a lack of physiological/immune adaptations to deal with the infection, as they did not co-evolve with these parasites (VALKIŪNAS, 2005). The high morbidity and mortality observed in penguins whenever they are exposed to avian plasmodia in captivity has led to concern that if mosquitoes were to be introduced to penguin breeding habitat where they had historically been absent, substantial morbidity and mortality could ensue (JONES; SHELLAM, 1999a,b; MILLER et al., 2001).

This is concerning for the endangered Galápagos penguins, for which recent population estimates indicate there are approximately 1800 individuals and demographic modeling suggests avian malaria could have dramatic effects on the species' probability

of persistence (MEILE et al., 2013). It is particularly concerning that extreme El Niño events – perhaps potentiated by climate change (COLLINS et al., 2010) – might simultaneously limit food availability for Galápagos penguins and heighten the transmission of *Plasmodium* sp (LEVIN et al., 2009; MEILE et al., 2013). Furthermore, Galápagos penguins clearly have not co-evolved with this parasite since the mosquito *C. quinquefasciatus* was introduced to the Galápagos Archipelago only in the late 1980s and *Plasmodium* sp was first detected only in the late 2000s (WHITEMAN et al., 2005; LEVIN et al., 2009). Fortunately the *Plasmodium* sp lineages detected at the Archipelago so far have failed to become established and produce significant disease in Galápagos penguins (LEVIN et al., 2013), however this could change if other lineages are introduced in the future. Penguin populations at other islands with relatively warm climate such as Tristan da Cunha and Gough Is. could also become at risk if mosquitoes become successfully established near human communities. On the other hand, while *Leucocytozoon* is relatively abundant and likely co-evolved with penguins in New Zealand (FALLIS et al., 1976; ALLISON et al., 1978; HILL et al., 2010; ARGILLA et al., 2013), there is evidence to suggest this parasite can be significantly pathogenic to penguins, particularly chicks (HILL, 2008; HILL et al., 2010; ARGILLA et al., 2013).

While the epidemiological effects of climate change on vector-borne pathogens are difficult to predict due to the ecological complexity involved (REITER, 2008), it is possible that the transmission of blood parasites to penguins will become heightened in the future (JONES; SHELLAM, 1999b). In this case, the incidence and impacts of *Plasmodium* and *Leucocytozoon* could be amplified and have detrimental effects on the populations of endangered penguins such as African and yellow-eyed penguins.

REFERENCES

- ALLEY, M. R.; MORGAN, K. J.; GILL, J. M.; HOCKEN, A. G. Diseases and causes of mortality in Yellow-eyed penguins, *Megadyptes antipodes*. **Kokako**, v. 11, n. 2, p. 18-23, 2004.
- ALLEY, M. R.; GARTRELL, B. D.; MORGAN, K. J. Severe outbreak of diphtheritic stomatitis in yellow-eyed penguins, *Megadyptes antipodes*. **Kokako**, v. 12, n. 1, p. 16, 2005.
- ALLISON, F. R.; DESSER, S. S.; WHITTEN, L. K. Further observations on the life cycle and vectors of the haemosporidian *Leucocytozoon tawaki* and its transmission to the Fiordland crested penguin. **New Zealand Journal of Zoology**, v. 5, p. 371-374, 1978.
- ANCEL, A.; BEAULIEU, M.; GILBERT, C. The different breeding strategies of penguins: A review. **Comptes Rendus Biologies**, v. 336, p. 1-12, 2013.
- ARGILLA, L. S.; HOWE, L.; GARTRELL, D.; ALLEY, M. R. High prevalence of *Leucocytozoon* spp. in the endangered yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*) in the sub-Antarctic regions of New Zealand. **Parasitology**, v. 140, n. 5, p. 672-682, 2013.
- ATKINSON, C. T. *Haemoproteus*. In: ATKINSON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. **Parasitic diseases of wild birds**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. p. 13-34.
- ATKINSON, C. T.; LAPOINTE, D. A. Introduced avian diseases, climate change, and the future of Hawaiian honeycreepers. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, n. 1, p. 53-63, 2009.
- ATKINSON, C. T.; VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: LOYE, J. E.; ZUK, M. **Bird-parasite interactions: ecology, evolution and behaviour**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 19-48.
- ATKINSON, C. T.; DUSEK, R. J.; LEASE, J. K. Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 1, p. 20-27, 2001.

AYBAR, C. A. V.; JURI, M. J. D.; GROSSO, M. S. L. de; SPINELLI, G. R. Species diversity and seasonal abundance of *Culicoides* biting midges in northwestern Argentina. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 24, p. 95-98, 2010.

BAK, Ung-Bok; PARK, Jae-Chan; LIM, Young-Jae. An outbreak of malaria in penguins at the Farm-land Zoo. **Korean Journal of Parasitology**, v. 22, n. 2, p. 267-272, 1984.

BARBOSA, A.; BENZAL, J.; VIDAL, V.; D'AMICO, V.; CORIA, N.; DIAZ, J.; MOTAS, M.; PALACIOS, M. J.; CUERVO, J. J.; ORTIZ, J.; CHITIMIA, L. Seabird ticks (*Ixodes uriae*) distribution along the Antarctic Peninsula. **Polar Biology**, v. 34, p. 1621-1624, 2011.

BATAILLE, A.; FOURNIÉ, G.; CRUZ, M.; CEDEÑO, V.; PARKER, P. G.; CUNNINGHAM, A. A.; GOODMAN, S. J. Host selection and parasite infection in *Aedes taeniorhynchus*, endemic disease vector in the Galápagos Islands. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1831-1841, 2012.

BECKER, D. A.; HOLLOWAY, H. L. A survey for Haematozoa in Antarctic vertebrates. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 87, n. 3, p. 354-360, 1968.

BEIER, J. C.; STOSKOPF, M. K. The epidemiology of avian malaria in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of Zoo Animal Medicine**, v. 11, n. 4, p. 99-105, 1980.

BEIER, J. C.; TRPIS, M. Incrimination of natural culicine vectors which transmit *Plasmodium elongatum* to penguins at the Baltimore Zoo. **Canadian Journal of Zoology**, v. 59, n. 3, p. 470-475, 1981.

BENNETT, G. F.; EARLÉ, R. A.; DU TOIT, H.; HUCHZERMEYER, F. W. A host-parasite catalogue of the haematozoa of the sub-Saharan birds. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 1, p. 1-73, 1992.

BORKENT, A. **World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae)**. 2013. Disponível em: <http://www.inhs.illinois.edu/files/8413/4219/9566/Ceratopogonidae_Catalog.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2013.

BROSSY, J. J. Malaria in wild and captive Jackass penguins *Spheniscus demersus* along the Southern African coast. **Ostrich**, v. 63, p. 10-12, 1992.

BROSSY, J. J. Haemoparasites in the African (Jackass) Penguin (*Spheniscus demersus*). **Penguin Conservation**, v. 6, n. 2, p. 20, 1993.

BROSSY, J. J.; PLÖS, A. L.; BLACKBEARD, J. M.; KLINE, A. Diseases acquired by captive penguins: what happens when they are released into the wild? **Marine Ornithology**, v. 27, p. 185-186, 1999.

BUENO, M. G.; LOPEZ, R. P. G.; MENEZES, R. M. T.; COSTA-NASCIMENTO, M. J.; LIMA, G. F. M. C.; ARAÚJO, R. A. S.; GUIDA, F. J. V.; KIRCHGATTER, K. Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo Zoo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1-2, p. 123-127, 2010.

CANNELL, B. L.; KRASNEC, K. V.; CAMPBELL, K.; JONES, H. I.; MILLER, R. D.; STEPHENS, N. The pathology and pathogenicity of a novel *Haemoproteus* spp. infection in wild Little Penguins (*Eudyptula minor*). **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 1-2, p. 74-84, 2013.

CARVAJAL, E. R.; ALVARADO, P. M. Pesquisa de *Plasmodium* spp. en pingüinos de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) de la Región de los Ríos: Malaria aviar como nueva patología de interés en la avifauna local. **Boletín Veterinario Oficial**, v. 10, p. 1-4, 2009.

CHAUVIN, A.; MOREAU, E.; BONNET, S.; PLANTARD, O.; MALANDRIN, L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v. 40, n. 37, p. 1-18, 2009.

CLARKE, J. R.; KERRY, K. R. Diseases and parasites of Penguins. **Korean Journal of Polar Research**, v. 4, n. 2, p. 79-96, 1993.

COLES, J. D. W. A. An epizootic in seabirds: A visit to Dassen and Malgas Islands. **Journal of the South African Veterinary Medicine Association**, v. 12, n. 1, p. 23-30, 1941.

COLLINS, M.; AN, S.-I.; CAI, W.; GANACHAUD, A.; GUILYARDI, E.; JIN, F.-F.; JOCHUM, M.; LENGAINNE, M.; POWER, S.; TIMMERMANN, A.; VECCHI, G.; WITTENBERG, A. The impact of global warming on the tropical Pacific Ocean and El Niño. **Nature Geoscience**, v. 3, p. 391-397, 2010.

COSGROVE, C. L.; DAY, K. P.; SHELDON, B. C. Coamplification of *Leucocytozoon* by PCR diagnostic tests for avian malaria: a cautionary note. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 6, p. 1362-1365, 2006.

CRANFIELD, M. R.; GRACZYK, T. K.; BEALL, F. B.; IALEGGIO, D. M.; SHAW, M. L.; SKJOLDAGER, M. L. Subclinical avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) and induction of parasite recrudescence. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, n. 3, p. 372-376, 1994.

CROCKETT, D. E.; KEARNS, M. P. Northern little blue penguin mortality in Northland. **Notornis**, v. 22, n. 1, p. 69-72, 1975.

CUNNINGHAM, M.; GIBBS, P.; ROGERS, T.; SPIELMAN, D.; WALRAVEN, E. **Ecology and health of the little penguin *Eudyptula minor* near Sydney**: a report prepared for the Water Board. Sydney: Taronga Zoo, 1993. 63 p.

DAVIS, L. S. Erect-crested penguin (*Eudyptes sclateri*). In: GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D. **Penguins**: natural history and conservation. Seattle: Washington University Press, 2013. p. 145-152.

DEHNHARD, N.; POISBLEAU, M.; DEMONGIN, L.; QUILLFELDT, P. Do leucocyte profiles reflect temporal and sexual variation in body condition over the breeding cycle in Southern Rockhopper Penguins? **Journal of Ornithology**, v. 152, p. 759-768, 2011a.

DEHNHARD, N.; POISBLEAU, M.; DEMONGIN, L.; CHASTEL, O.; van NOORDWIJK, H. J.; QUILLFELDT, P. Leucocyte profiles and corticosterone in chicks of southern rockhopper penguins. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 181, p. 83-90, 2011b.

DESSER, S. S.; ALLISON, F. Aspects of the sporogonic development of *Leucocytozoon tawaki* of the Fiordland crested penguin in its primary vector, *Austrosimulium unguatum*: an ultrastructural study. **Journal of Parasitology**, v. 65, n. 5, p. 737-744, 1979.

DIETRICH, M.; GÓMEZ-DÍAZ, E.; McCOY, K. D. Worldwide distribution and diversity of seabird ticks: implications for the ecology and epidemiology of tick-borne pathogens. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 5, p. 453-470, 2011.

DINHOPL, N.; MOSTEGL, M. M.; RICHTER, B.; NEDOROST, N.; MADERNER, A.; FRAGNER, K.; WEISSENBOCK, H. Application of in-situ hybridization for the detection

and identification of avian malaria parasites in paraffin wax-embedded tissues from captive penguins. **Avian Pathology**, v. 40, n. 3, p. 315-320, 2011.

DONOVAN, T. A.; SCHRENZEL, M.; TUCKER, T. A.; PESSIER, A. P.; STALIS, I. H. Hepatic hemorrhage, hemocoelom, and sudden death due to *Haemoproteus* infection in passerine birds: eleven cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 304-313, 2008.

DSEWPC. DEPARTMENT OF SUSTAINABILITY, ENVIRONMENT, WATER, POPULATION AND COMMUNITIES. **Species profile and threats database: *Eudyptula minor* — little penguin**. 2012. Disponível em: <http://www.environment.gov.au/cgi-bin/sprat/public/publicspecies.pl?taxon_id=1085>. Acesso em: 12 dez. 2012.

DUIGNAN, P. J. Diseases of penguins. **Surveillance**, v. 28, n. 4, p. 5-11, 2001.

DUMBLETON, L. J. The classification and distribution of the Simuliidae (Diptera) with particular reference to the genus *Austrosimulium*. **New Zealand Journal of Science**, v. 6, p. 320-357, 1963.

EARLÉ, R. A.; BENNETT, G. F.; BROSSY, J. J. First African record of *Leucocytozoon tawaki* (Apicomplexa: Leucocytozoidae) from the jackass penguin *Spheniscus demersus*. **South African Journal of Zoology**, v. 27, n. 2, 89-90, 1992.

EARLÉ, R. A.; HUCHZERMEYER, F. W.; BENNETT, G. F.; BROSSY, J. J. *Babesia peircei* sp. nov. from the jackass penguin. **African Zoology**, v. 28, n. 2, p. 88-90, 1993.

EJIRI, H.; SATO, Y.; SAWAI, R.; SASAKI, E.; MATSUMOTO, R.; UEDA, M.; HIGA, Y.; TSUDA, Y.; OMORI, S.; MURATA, K.; YUKAWA, M. Prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at a zoological garden in Japan. **Parasitology Research**, v. 105, n. 3, p. 629-633, 2009.

FALLIS, A. M.; BISSET, S. A.; ALLISON, F. R. *Leucocytozoon tawaki* n.sp. (Eucoccida: Leucocytozoidae) from the penguin *Eudyptes pachyrhynchus*, and preliminary observations on its development in *Austrosimulium* spp. (Diptera: Simuliidae). **New Zealand Journal of Zoology**, v. 3, n. 1, p. 11-16, 1976.

FANTHAM, H. B.; PORTER, A. On a *Plasmodium* (*Plasmodium relictum* var. *spheniscidae*, n. var.), observed in four species of penguins. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 114, p. 279-292, 1944.

FIX, A. S.; WATERHOUSE, C.; GREINER, E. C.; STOSKOPF, M. K. *Plasmodium relictum* as a cause of avian malaria in wild-caught Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 4, p. 610-619, 1988.

FLEISCHMAN, R. W.; SQUIRE, R. A.; SLADEN, W. J. L.; MOORE, J. Pathologic confirmation of malaria (*Plasmodium elongatum*) in African penguins (*Spheniscus demersus*). **Bulletin of the Wildlife Disease Association**, v. 4, p. 133-135, 1968a.

FLEISCHMAN, R. W.; SQUIRE, R. A.; SLADEN, W. J. L.; MELBY Jr., E. C. Malaria (*Plasmodium elongatum*) in captive African penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 153, n. 7, p. 928-935, 1968b.

FORRESTER, D. J.; GREINER, E. C. Leucocytozoonosis. In: ATKINSON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. **Parasitic diseases of wild birds**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. p. 54-107.

FREED, L. A.; CANN, R. L. On polymerase chain reaction tests for estimating prevalence of malaria in birds. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 6, p. 1261-1264, 2003.

FREED, L. A.; CANN, R. L. DNA quality and accuracy of avian malaria PCR diagnostics: a review. **Condor**, v. 108, p. 459-473, 2006.

FRETWELL, P. T.; LARUE, M. A.; MORIN, P.; KOOYMAN, G. L.; WIENECKE, B.; RATCLIFFE, N.; FOX, A. J.; FLEMING, A. H.; PORTER, C.; TRATHAN, P. N. An Emperor penguin population estimate: the first global, synoptic survey of a species from space. **PLOS One**, v. 7, n. 4, e33751, 2012.

GARAMSZEGLI, L. Z. The sensitivity of microscopy and PCR-based detection methods affecting estimates of prevalence of blood parasites in birds. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1197-1203, 2010.

GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D. **Penguins: natural history and conservation**. Seattle: Washington University Press, 2013. 328 p.

GASTON, K. J.; JONES, A. G.; HÄNEL, C.; CHOWN, S. L. Rates of species introduction to a remote oceanic island. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 270, p. 1091-1098, 2003.

GAUTHIER-CLERC, M.; JAULHAC, B.; FRENOT, Y.; BACHELARD, C.; MONTEIL, H.; LE MAHO, Y.; HANDRICH, Y. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* (the Lyme disease agent) antibodies in king penguin *Aptenodytes patagonicus* in Crozet Archipelago. **Polar Biology**, v. 22, p. 141-143, 1999.

GILL, J. M.; DARBY, J. T. Deaths in yellow-eyed penguins (*Megadyptes antipodes*) on the Otago Peninsula during the summer of 1990. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 41, p. 39-42, 1993.

GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; HERNÁNDEZ, J.; MORENO, L.; HERRMAN, B.; PALMA, R.; LATORRE, A.; MEDINA-VOGEL, G.; KINSELLA, M. J.; MARTÍN, N.; ARAYA, K.; TORRES, I.; FERNANDEZ, N.; OLSEN, B. Health evaluation of wild gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) in the Antarctic Peninsula. **Polar Biology**, v. 36, p. 1749-1760, 2013.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; McCUTCHAN, T. F.; BICKNESE, E. J. Characteristics of naturally acquired avian malaria infections in naive juvenile African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Parasitological Research**, v. 80, p. 634-637, 1994a.

GRACZYK, T. D.; CRANFIELD, M. R.; SKJOLDAGER, M. L.; SHAW, M. L. An ELISA for detecting anti-*Plasmodium* spp. antibodies in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 1, p. 60-66, 1994b.

GRACZYK, T. K.; BROSSY, J. J.; PLÖS, A.; STOSKOPF, M. K. Avian malaria seroprevalence in Jackass penguins (*Spheniscus demersus*) in South Africa. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 5, p. 703-707, 1995a.

GRACZYK, T. K.; COCKREM, J. F.; CRANFIELD, M. R.; DARBY, J. T.; MOORE, P. Avian malaria seroprevalence in wild New Zealand penguins. **Parasite**, v. 2, p. 401-405, 1995b.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; BROSSY, J. J.; COCKREM, J. F.; JOUVENTIN, P.; SEDDON, P. J. Detection of avian malaria infections in wild and captive penguins. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v. 62, n. 2, p. 135-141, 1995c.

GRACZYK, T. K.; BROSSY, J. J.; SANDERS, M. I.; DUBEY, J. P.; PLÖS, A.; STOSKOPF, M. K. Immunological survey of babesiosis (*Babesia peircei*) and toxoplasmosis in Jackass penguins in South Africa. **Parasite**, v. 4, p. 313-319, 1996.

GRIM, K. C.; van der MERWE, E.; SULLIVAN, M.; PARSONS, N.; McCUTCHAN, T. F.; CRANFIELD, M. *Plasmodium juxtannucleare* associated with mortality in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 34, n. 3, p. 250-255, 2003.

GRINER, L. A.; SHERIDAN, B. W. Malaria (*Plasmodium relictum*) in penguins at the San Diego Zoo. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 1, p. 7-17, 1967.

GRÜNBERG, W.; KUTZER, E. Infektionen mit *Plasmodium praecox* bei Humboldt- (*Spheniscus humboldti*) und Brillenpinguinen (*Spheniscus magellanicus*). **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene**, v. 189, p. 511-520, 1963.

HÄNEL, C.; CHOWN, S. L.; DAVIES, L. Records of alien insect species from sub-Antarctic Marion and South Georgia Islands. **African Entomology**, v. 6, n. 2, p. 366-369, 1998.

HANSON, B. A.; LUTTRELL, M. P.; GOEKJIAN, V. H.; NILES, L.; SWAYNE, D. E.; SENNE, D. A.; STALLKNECHT, D. E. Is the occurrence of avian influenza virus in Charadriiformes species and location dependent? **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, n. 2, p. 351-361, 2008.

HARMON, W.; HARBECKER, A.; CLARK, W. A. Parasite studies in the Galapagos. In: _____. **Report to the Charles Darwin research station**. Puerto Ayora: Charles Darwin Research Station, 1985. p. 35-39.

HARVEY, C.; ALLEY, M. R. Current veterinary laboratory surveillance of avian haemoparasitic diseases in New Zealand. **Kokako**, v. 15, n. 1, p. 15-19, 2008.

HAWKEY, C. M.; HORSLEY, D. T.; KEYMER, I. F. Haematology of wild penguins (*Sphenisciformes*) in the Falkland islands. **Avian Pathology**, v. 18, n. 3, p. 495-502, 1989.

HERMAN, C. M.; KOCAN, R. M.; SNYDER, E. L.; KNISLEY, J. O. *Plasmodium elongatum* from a penguin. **Bulletin of the Wildlife Disease Association**, v. 4, p. 132, 1968.

HERMAN, C. M.; GRAY, C.; KNISLEY Jr., J. O.; KOCAN, R. M. Malarial infections in the avian collection of the National Zoo in Washington, D.C., USA and in indigenous birds.

In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PARASITOLOGY, 3; 1974, Munich.
Proceedings... Munich: ICOPA, 1974. p. 1677-1678.

HILL, A. G. **An investigation of *Leucocytozoon* in the endangered Yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*)**. 2008. 132 f. Thesis (Master of Veterinary Science) - Massey University, Turitea, 2008.

HILL, A. G.; HOWE, L.; GARTRELL, B. D.; ALLEY, M. R. Prevalence of *Leucocytozoon* spp, in the endangered yellow-eyed penguin *Megadyptes antipodes*. **Parasitology**, v. 137, n. 10, p. 1477-1485, 2010.

HOLDER, P. The mosquitoes of New Zealand and their animal disease significance. **Surveillance**, v. 26, n. 4, p. 12-15, 1999.

HOOGESTEYN, A. L.; CUNNINGHAM, A. Development of an indirect immunofluorescent test for the detection of malaria antibodies in penguins (Sphenisciformes). In: ANNUAL CONFERENCE OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 29; 1996, Puerto Vallarta. **Proceedings...** Puerto Vallarta: AAZV, 1996. p. 584-585.

HUFF, C. G. Schizogony and gametocyte development in *Leucocytozoon simondi*, and comparisons with *Plasmodium* and *Haemoproteus*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 71, n. 1, p. 18-32, 1942.

HUFF, G. C.; SHIROISHI, T. S. Natural infection of Humboldt's penguin with *Plasmodium elongatum*. **Journal of Parasitology**, v. 48, n. 3, p. 495, 1962.

IEZHOVA, T. A.; VALKIŪNAS, G.; LOISEAU, C.; SMITH, T. B.; SEHGAL, R. N. M. *Haemoproteus cyanomitrae* sp. nov. (Haemosporida: Haemoproteidae) from a widespread African songbird, the Olive sunbird, *Cyanomitra olivaceae*. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 137-143, 2010.

IEZHOVA, T. A.; DODGE, M.; SEHGAL, R. N. M.; SMITH, T. B.; VALKIŪNAS, G. New avian *Haemoproteus* species (Haemosporida: Haemoproteidae) from African birds, with a critique of the use of host taxonomic information in hemoproteid classification. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 4, p. 682-694, 2011.

IUCN. INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **IUCN Red List of Threatened Species Version 2013.2**. 2014. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

JONES, H. I. Notes on parasites in penguins (Spheniscidae) and petrels (Procellariidae) in the Antarctic and Sub-antarctic. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 1, p. 166-167, 1988.

JONES, H. I.; SHELLAM, G. R. The occurrence of blood-inhabiting protozoa in captive and free-living penguins. **Polar Biology**, v. 21, p. 5-10, 1999a.

JONES, H. I.; SHELLAM, G. R. Blood parasites in penguins, and their potential impact on conservation. **Marine Ornithology**, v. 27, p. 181-184, 1999b.

JONES, H. I.; WOEHLER, E. J. A new species of blood trypanosome from little penguins (*Eudyptula minor*) in Tasmania. **Journal of Protozoology**, v. 36, n. 4, p. 389-390, 1989.

JOUVENTIN, P.; CUTHBERT, R. J.; OTTVALL, R. Genetic isolation and divergence in sexual traits: evidence for the northern rockhopper penguin *Eudyptes moseleyi* being a sibling species. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 3413-3423, 2006.

JOVANI, R.; TELLA, J. L.; FORERO, M. G.; BERTELOTTI, M.; BLANCO, G.; CEBALLOS, O.; DONÁZAR, J. Á. Apparent absence of blood parasites in the Patagonian seabird community: is it related to the marine environment? **Waterbirds**, v. 24, p. 430-433, 2001.

KARESH, W. B.; UHART, M. M.; FRERE, E.; GANDINI, P.; BRASELTON, E.; PUCHE, H.; COOK, R. A. Health evaluation of free-ranging rockhopper penguins (*Eudyptes chrysocomes*) in Argentina. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 30, n. 1, p. 25-31, 1999.

KEYMER, I. F.; MALCOLM, H. M.; HUNT, A.; HORSLEY, D. T. Health evaluation of penguins (Sphenisciformes) following mortality in the Falklands (South Atlantic). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 45, p. 159-169, 2001.

KO, Kyeong-Nam; KANG, Sang-Chul; JUNG, Ji-Youl; BAE, Jong-Hee; KIM, Jae-Hoon. Avian malaria associated with *Plasmodium* spp. infection in a penguin in Jeju Island. **Korean Journal of Veterinary Research**, vol. 48, n. 2, p. 197-201, 2008.

LACORTE, G. A.; FÉLIX, G. M. F.; PINHEIRO, R. R. B.; CHAVES, A. V.; ALMEIDA-NETO, G.; NEVES, F. S.; LEITE, L. O.; SANTOS, F. R.; BRAGA, É. M. Exploring the diversity and distribution of Neotropical avian malaria parasites – a molecular survey from Southeast Brazil. **PLOS One**, v. 8, n. 3, p. e57770, 2013.

LAIRD, M. Some blood parasites of New Zealand. **Zoological Publications of Victoria University College**, v. 5, p. 1-20, 1950.

LAIRD, M. Protozoological studies at Macquarie Islands. **Transactions of the Royal Society of New Zealand**, v. 79, n. 3-4, p. 583-588, 1952.

LAIRD, M. A lack of avian and mammalian haematozoa in the Antarctic and Canadian Arctic. **Canadian Journal of Zoology**, v. 39, p. 209-213, 1961.

LAIRD, M.; VAN RIPER, C. Questionable reports of *Plasmodium* from birds in Hawaii, with the recognition of *P. relictum* ssp. *capistranoae* (Russel, 1932) as the avian malaria parasite there. In: CANNING, E. U. **Parasitological topics**: a presentation volume to P.C.C. Garnham, F.R.S. on the occasion of his 80th birthday 1981. Lawrence: Allen Press, 1981. p. 159-165.

LEVIN, I. I.; OUTLAW, D. C.; VARGAS, F. H.; PARKER, P. G. *Plasmodium* blood parasite found in endangered Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). **Biological Conservation**, v. 142, p. 3191-3195, 2009.

LEVIN, I. I.; VALKIŪNAS, G.; SANTIAGO-ALARCON, D.; CRUZ, L. L.; IEZHOVA, T. A.; O'BRIEN, S. L.; HAILER, F.; DEARBORN, D.; SHCREIBER, E. A.; FLEISCHER, R. C.; RICKLEFS, R. E.; PARKER, P. G. Hippoboscids-transmitted *Haemoproteus* parasites (Haemosporida) infect Galapagos Pelecaniform birds: Evidence from molecular and morphological studies, with a description of *Haemoproteus iwa*. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 1019-1027, 2011.

LEVIN, I. I.; VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; O'BRIEN, S. L.; PARKER, P. G. Novel *Haemoproteus* species (Haemosporida: Haemoproteidae) from the swallow-tailed gull (Lariidae), with remarks on the host range of Hippoboscids-transmitted avian hemoproteids. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 4, p. 847-854, 2012.

LEVIN, I. I.; ZWIERS, P.; DEEM, S. L.; GEEST, E. A.; HIGASHIGUCHI, J. M.; IEZHOVA, T. A.; JIMÉNEZ-UZCÁTEGUI, G.; KIM, D. H.; MORTON, J. P.; PERLUT, N. G.; RENFREW, R. B.; SARI, E. H. R.; VALKIŪNAS, G.; PARKER, P. G. Multiple lineages of avian malaria parasites (*Plasmodium*) in the Galapagos islands and

evidence for arrival via migratory birds. **Conservation Biology**, v. 27, n. 6, p. 1366-1377, 2013.

MARTINSEN, E. S.; PERKINS, S. L. The diversity of *Plasmodium* and other Haemosporidians: The interesection of taxonomy, phylogenetics and genomics. In: CARLTON, J. M.; PERKINS, S. L.; DEITSCH, K. W. **Malaria parasites: comparative genomics, evolution and molecular biology**. Norfolk: Caister Academic Press, 2013. p. 1-15.

McCONKEY, G. A.; LI, J.; ROGERS, M. J.; SEELEY, D. C.; GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; McCUTCHAN, T. C. Parasite diversity in an endemic region for avian malaria and identification of a parasite causing penguin mortality. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 393-399, 1996.

McDONALD, S. P. **Parasitology of the Yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*)**. 2012. 214 f. Thesis (Master of Science) - University of Otago, Dunedin, 2012.

McFARLANE, R. A. Some observations on Adelie penguin (*Pygoscelis adeliae*) mortality in East Antarctica. **Avian Pathology**, v. 25, n. 1, p. 187-190, 1996.

MEDLOCK, J. M.; SCHAFFNER, F.; FONTENILLE, D. **Invasive mosquitoes in the European associate continental and overseas territories**. 2010. Disponível em: <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvicelayouts/forms/Review_DisForm.aspx?ID=212&List=a3216f4c-f040-4f51-9f77-a96046dbfd72>. Acesso em: 16 feb. 2014.

MEILE, R. J.; LACY, R. C.; VARGAS, F. H.; PARKER, P. G. Modeling *Plasmodium* parasite arrival in the Galapagos Penguin (*Spheniscus mendiculus*). **Auk**, v. 130, n. 3, p. 440-448, 2013.

MERINO, S.; BARBOSA, A.; MORENO, J.; POTTI, J. Absence of haematozoa in a wild chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica* population. **Polar Biology**, v. 18, p. 227-228, 1997.

MERINO, S.; MORENO, J.; VÁSQUEZ, R. A.; MARTÍNEZ, J.; SÁNCHEZ-MONSÁLVEZ, I.; ESTADES, C. F.; IPPI, S.; SABAT, P.; ROZZI, R.; McGEHEE, S. Haematozoa in forest birds from southern Chile: Latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. **Austral Ecology**, v. 33, p. 329-340, 2008.

MERKEL, J.; JONES, H. I.; WHITEMAN, N. K.; GOTTDENKER, N.; VARGAS, H.; TRAVIS, E. K.; MILLER, R. E.; PARKER, P. G. Microfilariae in Galápagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) and flightless cormorants (*Phalacrocorax harrisi*). **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 3, p. 495-503, 2007.

MILLER, G. D.; HOFKIN, B. V.; SNELL, H.; HAHN, A.; MILLER, R. D. Avian malaria and Marek's disease: potential threats to Galapagos penguins *Spheniscus mendiculus*. **Marine Ornithology**, v. 29, p. 43-46, 2001.

MITCHELL, C. J.; DARSIE, R. F. Mosquitoes of Argentina: Part II. Geographic distribution and bibliography (Diptera, Culicidae). **Mosquito Systematics**, v. 17, n. 4, p. 279-360, 1985.

MORENO, J.; LEÓN, A. de; FARGALLO, J. A.; MORENO, E. Breeding time, health and immune response in the chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica*. **Oecologia**, v. 115, p. 312-319, 1998.

MORENO, J.; YORIO, P.; GARCIA-BORBOROGLU, P.; POTTI, J.; VILLAR, S. Health state and reproductive output in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Ethology, Ecology and Evolution**, v. 14, p. 19-28, 2002.

MORTIMER, L.; LILL, A. Activity-related variation in blood parameters associated with oxygen transport and chronic stress in little penguins. **Australian Journal of Zoology**, v. 55, p. 249-256, 2007.

MURRAY, M. D. Potential vectors of bluetongue in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, p. 216-220, 1975.

MYKYTOWYCZ, R.; HESTERMAN, E. R. A note on tick infestation of the fairy penguin, *Eudyptula minor* Forster. **CSIRO Wildlife Research**, v. 2, p. 165-166, 1957.

MYRCHA, A.; KOSTELECKA-MYRCHA, A. Hematological studies on Antarctic birds: I. Hematological indices in some species of the birds studied during Australian summer. **Polish Polar Research**, v. 1, n. 2-3, p. 169-173, 1980.

OBENDORF, D. L.; MCCOLL, K. Mortality in little penguins (*Eudyptula minor*) along the coast of Victoria, Australia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 16, n. 2, p. 251-259, 1980.

OLIVER, W. R. B. The crested penguins of New Zealand. **Emu**, v. 53, p. 185-187, 1953.

OLSEN, B.; MUNSTER, V. J.; WALLENSTEN, A.; WALDENSTRÖM, J.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; FOUCHIER, R. A. M. Global patterns of Influenza A Virus in wild birds. **Science**, v. 312, p. 384-388, 2006.
PALMER, J. L.; McCUTCHAN, T. F.; VARGAS, F. H.; DEEM, S. L.; CRUZ, M.; HARTMAN, D. A.; PARKER, P. G. Seroprevalence of malarial antibodies in Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 5, p. 770-776, 2013.

PAPERNA, I.; GILL, H. Schizogonic stages of *Haemoproteus* from Wenyon's Baghdad sparrows are also found in *Passer domesticus* biblicus in Israel. **Parasitological Research**, v. 91, p. 486-490, 2003.

PARKER, P. G.; WHITEMAN, N. K.; MILLER, R. E. Conservation medicine on the Galapagos islands: partnerships among behavioral, population and veterinary scientists. **Auk**, v. 123, n. 3, p. 625-638, 2006.

PARSONS, N. J.; UNDERHILL, L. G. Oiled and injured African penguins *Spheniscus demersus* and other seabirds admitted for rehabilitation. **African Journal of Marine Science**, v. 27, n. 1, p. 289-296, 2005.

PARSONS, N. J.; PEIRCE, M. A.; STRAUSS, V. New species of haematozoa in Phalacrocoracidae and Stercorariidae in South Africa. **Ostrich**, v. 81, p. 103-108, 2010.

PEIRCE, M. A. A taxonomic review of avian piroplasms of the genus *Babesia* Starcovici, 1893. **Journal of Natural History**, v. 34, p. 317-332, 2000.

PEIRCE, M. A. A checklist of the valid avian species of *Babesia* (Apicomplexa: Piroplasmorida), *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida), and *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). **Journal of Natural History**, v. 39, p. 3621-3632, 2005.

PEIRCE, M. A.; PRINCE, P. A. *Hepatozoon albatrossi* sp. nov. (Eucoccida: Hepatozoidae) from *Diomedea* spp. in the Antarctic. **Journal of Natural History**, v. 14, n. 3, p. 447-452, 1980.

PEIRCE, M. A.; GREENWOOD, A. G.; STIDWORTHY, M. F. *Leucocytozoon* in captive penguins. **Veterinary Record**, v. 157, n. 25, p. 819-820, 2005.

PENRITH, M.-L.; HUCHZERMEYER, F. W.; WET, S. C.; PENRITH, M. J. Concurrent infection with *Clostridium* and *Plasmodium* in a captive king penguin *Aptenodytes patagonicus*. **Avian Pathology**, v. 23, n. 2, p. 373-380, 1994.

QUILLFELDT, P.; MARTÍNEZ, J.; HENNICKE, J.; LUDYNIA, K.; GLADBACH, A.; MASELLO, J. F.; RIOU, S.; MERINO, S. Hemosporidian blood parasites in seabirds: a comparative genetic study of species from Antarctic to tropical habitats. **Naturwissenschaften**, v. 97, p. 809-817, 2010.

RAETHEL, H. S. Plasmodieninfektionen bei Pinguinen des Berliner Zoologischen Gartens und ihre Bedeutung für die Pinguinhaltung. **Kleintier-Praxis**, v. 5, p. 64-70, 1960.

REDROBE, S. *Plasmodium* infection in a group of captive penguins including rockhopper penguins, king penguins, gentoo penguins, Macaroni penguin. In: SCIENTIFIC MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION OF ZOO AND WILDLIFE VETERINARIANS, 3; 2000, Paris. **Proceedings...** Paris: EAZWV, 2000. p. 1-5.

REITER, P. Climate change and mosquito-borne disease: knowing the horse before hitching the cart. **Revue Scientifique et Technique (Office International des Épizooties)**, v. 27, n. 2, p. 383-398, 2008.

REWELL, R. E. Report of the pathologist for the year 1947. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 118, n. 2, p. 501-514, 1948.

RICHARD, F. A.; SEHGAL, R. N. M.; JONES, H. I.; SMITH, T. B. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 4, p. 819-822, 2002.

RODHAIN, J. L'infection a *Plasmodium relictum* chez les pingouins. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 27, n. 2, p. 139-157, 1939.

RODHAIN, J.; ANDRIANNE, V.-F. Deux nouveaux cas d'infestation par *Plasmodium* chez des pingouins. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 27, n. 6, p. 573-577, 1952.

SAMSON, A. C. R. The impact of monoclonal antibodies on virus diagnosis. **BioEssays**, v. 5, n. 6, p. 275-276, 1986.

SCHLATTER, R. P.; PAREDES, E.; ULLOA, J.; HARRIS, J.; ROMERO, A.; VASQUEZ, J.; LIZAMA, A.; HERNÁNDEZ, C.; SIMEONE, A. Mortandad de pinguino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) en Queule, Región de la Araucanía, Chile. **Boletín Chileno de Ornitología**, v. 15, n. 2, p. 78-86, 2009.

SCHNITTGER, L.; RODRIGUEZ, A. E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; MORRISON, D. A. *Babesia*: a world emerging. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1788-1809, 2012.

SCHULTZ, A.; PETERSEN, S. L. Absence of haematozoa in breeding Macaroni *Eudyptes chrysolophus* and rockhopper *E. chrysocome* penguins at Marion Island. **African Journal of Marine Science**, v. 25, n. 1, p. 499-502, 2003.

SCOTT, H. H. Report on the deaths occurring in the Society's Gardens during the year 1926. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 97, n. 1, p. 173-198, 1927.

SERGEANT, N.; ROGERS, T.; CUNNINGHAM, M. Influence of biological and ecological factors on hematological values in wild little penguins, *Eudyptula minor*. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 138, p. 333-339, 2004.

SIERS, S.; MERKEL, J.; BATAILLER, A.; VARGAS, F. H.; PARKER, P. G. Ecological correlates of microfilariae prevalence in endangered Galápagos birds. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 2, p. 259-272, 2010.

SILVEIRA, P.; DAMATTA, R. A.; DAGOSTO, M. Hematological changes of chickens experimentally infected with *Plasmodium (Bennettinia) juxtanucleare*. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 257-262, 2009.

SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; LACORTE, G. A.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; VANSTREELS, R. E. T.; STEINDEL, M.; CATÃO-DIAS, J. L.; VALKIŪNAS, G.; BRAGA, É. M. Parasitological and new molecular-phylogenetic characterization of the malaria parasite *Plasmodium tejeraei* in South American penguins. **Parasitology International**, v. 62, p. 165-171, 2013.

SINCLAIR, B. J. CDF Checklist of Galapagos Flies. In: BUNGARTZ, F.; HERRERA, H.; JARAMILLO, P.; TIRADO, N.; JIMÉNEZ-UZCÁTEGUI, G.; RUIZ, D.; GUÉZOU, A.; ZIEMMECK, F. **Charles Darwin Foundation Galapagos Species Checklist**. Puerto Ayora: Charles Darwin Foundation, 2014. Disponível em: <<http://www.darwinfoundation.org/datazone/checklists/>>. Acesso em: 19 feb. 2014.

SLADEN, W. J. L.; GAILEY-PHIPPS, J. J.; DIVERS, B. J. Medical problems and treatment of penguins at the Baltimore Zoo. **International Zoo Yearbook**, v. 19, p. 202-209, 1979.

SMITH, K. M.; KARESH, W. B.; MAJLUF, P.; PAREDES, R.; ZAVALAGA, C.; REUL, A. H.; STETTER, M.; BRASELTON, W. E.; PUCHE, H.; COOK, R. A. Health evaluation of free-ranging Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) in Peru. **Avian Diseases**, v. 52, p. 130-135, 2008.

SNELL, A. E. The discovery of the exotic mosquito *Ochlerotatus australis* and the endemic *Opifex fuscus* (Diptera: Culicidae) on North East Island, Snares Islands. **Weta**, v. 30, p. 10-13, 2005.

SPINELLI, G. R.; MARTINEZ, M. E. The genus *Culicoides* in Uruguay (Diptera: Ceratopogonidae). **Insecta Mundi**, v. 5, n. 3-4, p. 175-179, 1991.

STOSKOPF, M. K.; BEIER, J. Avian malaria in African black-footed penguins. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 175, n. 9, p. 944-947, 1979.

STURROCK, H. J. W.; TOMPKINS, D. M. Avian malaria (*Plasmodium* spp) in yellow-eyed penguins: Investigating the cause of high seroprevalence but low observed infection. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 55, n. 4, p. 158-160, 2007.

STURROCK, H. J. W.; TOMPKINS, D. M. Avian malaria parasites (*Plasmodium* spp.) in Dunedin and on the Otago Peninsula, southern New Zealand. **New Zealand Journal of Ecology**, v. 32, n. 1, p. 98-102, 2008.

SZÖLLŐSI, E.; HELLGREN, O.; HASSELQUIST, D. A cautionary note on the use of nested PCR for parasite screening – an example from avian blood parasites. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 2, p. 562-564, 2008.

TABACHNICK, W. J. *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. **Veterinaria Italiana**, v. 40, n. 3, p. 144-150, 2004.

TELLA, J. L.; FORERO, M. G.; BERTELOTTI, M.; DONÁZAR, J. A.; BLANCO, G.; CEBALLOS, O. Offspring body condition and immunocompetence are negatively affected by high breeding densities. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 268, p. 1455-1461, 2001.

TOLLINI, J.; BROCKSEN, A.; SUREDA, N. Prevention and treatment of avian malaria in a captive penguin colony. **Penguin Conservation**, v. 13, n. 1, p. 28-31, 2000.

TOMPKINS, D. M.; GLEESON, D. M. Relationship between avian malaria distribution and an exotic invasive mosquito in New Zealand. **Journal of the Royal Society of New Zealand**, v. 36, n. 2, p. 51-62, 2006.

TRAVIS, E. K.; VARGAS, F. H.; MERKEL, J.; GOTTDENKER, N.; MILLER, R. E.; PARKER, P. G. Hematology, serum chemistry, and serology of Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) in the Galápagos Islands, Ecuador. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 3, p. 625-632, 2006.

VALKIŪNAS, G. **Avian malaria parasites and other haemosporidia**. Boca Ratón: CRC Press, 2005. 932 p.

VALKIŪNAS, G.; BENSCH, S.; IEZHOVA, T. A.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; HELLGREN, O.; BOLSHAKOV, C. V. Nested cytochrome B polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 418-422, 2006.

VALKIŪNAS, G.; ZEHTINDJIEV, P.; DIMITROV, D.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; IEZHOVA, T. A.; BENSCH, S. Polymerase chain reaction-based identification of *Plasmodium (Huffia) elongatum*, with remarks on species identity of haemosporidian lineages deposited in GenBank. **Parasitological Research**, v. 102, p. 1185-1193, 2008.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; LOISEAU, C.; SEHGAL, R. N. Nested cytochrome B polymerase chain reaction diagnostics detect sporozoites of hemosporidian parasites in peripheral blood of naturally infected birds. **Journal of Parasitology**, v. 95, p. 1512-1515, 2009.

VALKIŪNAS, G.; SANTIAGO-ALARCON, D.; LEVIN, I. I.; IEZHOVA, T. A.; PARKER, P. G. A new *Haemoproteus* species (Haemosporida: Haemoproteidae) from the endemic Galapagos dove *Zenaida galapagoensis*, with remarks on the parasite distribution, vectors, and molecular diagnostics. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 783-792, 2010.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; EVANS, E.; CARLSON, J. S.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, J. E.; SEHGAL, R. N. M. Two new *Haemoproteus* species (Haemosporida: Haemoproteidae) from Columbiform birds. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 513-521, 2013.

VAN RENSBURG, M. J. **Parasitism, disease and breeding ecology of little blue penguins (*Eudyptula minor*) on Tiritiri Matangi Island, New Zealand**. 2010. 229 f. Thesis (Master of Science) - Massey University, Auckland, 2010.

VAN RIPER III, C.; VAN RIPER, S. G.; GOFF, M. L.; LAIRD, M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. **Ecological Monographs**, v. 56, n. 4, p. 327-344, 1986.

VANSTREELS, R. E. T.; MIRANDA, F. R.; RUOPPOLO, V.; REIS, A. O. A.; COSTA, E. S.; PESSÔA, A. R. L.; TORRES, J. P. M.; CUNHA, L. S. T.; PIUCO, R. C.; VALIATI, V. H.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; LABRUNA, M. B.; PETRY, M. V.; EPIPHANIO, S.; CATÃO-DIAS, J. L. Investigation of blood parasites of pygoscelid penguins at the King George and Elephant Islands, South Shetlands Archipelago, Antarctica. **Polar Biology**, v. 37, p. 135-139, 2014.

VARNEY, K. 2006. Quarterly review of diagnostic cases – October to December 2005: Gribbles Veterinary Pathology. **Surveillance**, v. 33, n. 1, p. 11-14, 2006.

VLECK, C. M.; VERTICALINO, N.; VLECK, D.; BUCHER, T. L. Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adelie penguins. **Condor**, v. 102, p. 392-400, 2000.

WALLACE, R. S.; TEARE, J. A.; DIEBOLD, E.; MICHAELS, M.; WILLIS, M. J. Hematology and plasma chemistry values in free-ranging Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) in Chile. **Zoo Biology**, v. 14, p. 311-316, 1995.

WHITE, G. B. Malaria. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION VECTOR BIOLOGY AND CONTROL DIVISION. **Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors**. Geneva: WHO, 1989. p. 7-22.

WHITEMAN, N. K.; GOODMAN, S. J.; SINCLAIR, B. J.; WALSH, T.; CUNNINGHAM, A. A.; KRAMER, L. D.; PARKER, P. G. Establishment of the avian disease vector *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) on the Galápagos Islands, Ecuador. **Ibis**, v. 147, n. 4, p. 844-847, 2005.

WILLIAMS, T. D. **The penguins: Spheniscidae**. Oxford: Oxford University Press, 1995. 233 p.

WIRTH, W. W.; FELIPPE-BAUER, M. L. The Neotropical biting midges related to *Culicoides paraensis* (Diptera: Ceratopogonidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 4, p. 551-565, 1989.

WRBU. WALTER REED BIOSYSTEMATICS UNIT. **VectorMap**: Know the vector, know the threat. 2014. Disponível em: <<http://www.vectormap.org/>>. Acesso em: 16 fev. 2014.

YABSLEY, M. J.; PARSONS, N. J.; HORNE, E. C.; SHOCK, B. C.; PURDEE, M. Novel relapsing fever *Borrelia* detected in African penguins (*Spheniscus demersus*) admitted to two rehabilitation centers in South Africa. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1125-1130, 2012.

ZINSMEISTER, V. A. P.; VANDERHEYDEN, M. J. N. Differential leucocyte cell counts from the pygoscelid penguins of Antarctica. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 23, n. 3, p. 521-523, 1987.

Appendix A - Studies that detected, attempted to detect or employed diagnostic methods that could have detected blood parasites in penguins. Records at *ex-situ* locations are indicated by an arrow and italics

Species and location [period of sample collection]	Diagnostic method number of wild individuals tested]	Parasites recorded [number of wild individuals positive]	References
<i>Aptenodytes forsteri</i> Victoria Land, Antarctica [1964-1966] Mawson Station, Kemp Land, Antarctica [1994]	TBS [1] TBS [50]	Negative Negative	Becker; Holloway, 1968 Jones; Shellam, 1999a
<i>Aptenodytes patagonicus</i> Macquarie Is. [1950] Elsehul, South Georgia Is. [1975-1978] Macquarie Is. [1982] Heard Is. [1985] → London, England → London, England → San Diego, California, USA → <i>Praetoria</i> , South Africa → Bristol, England	TBS [17] TBS [44] TBS [34] TBS [8] TBS TBS TBS+HP TBS+HP TBS	Negative Negative Negative Negative <i>P. relatum</i> <i>P. relatum</i> <i>P. relatum</i> <i>P. relatum</i> <i>Plasmodium</i> sp	Laird, 1952 Peirce; Prince, 1980 Jones, 1988 Jones, 1988 Scott, 1927; Fartham; Porter, 1944 Rewell, 1948 Griner; Sheridan, 1967 Penrith et al., 1994 Redrobe, 2000
<i>Eudyptes chrysocome</i> Macquarie Is. [1950] Falkland/Malvinas Is. [1986-1987] Falkland/Malvinas Is. [1985-1986] Falkland/Malvinas Is. [1987] Pinguino Is., Santa Cruz, Argentina [1994] Marion Is. [2001] New Island, Falkland/Malvinas Is. [2006-2007] New Island, Falkland/Malvinas Is. [2006-2007] New Island, Falkland/Malvinas Is. [2007-2009] → Vienna, Austria	TBS [42] TBS [50] ^A HP [15] TBS+HP [32] TBS [15] TBS [80] TBS [45] ^A TBS [86] ^A TBS+PCR _{HP} +PCR _{28S} TBS+PCR _{HP} +ISH	Negative Negative Negative Negative Negative Negative Negative Negative <i>Plasmodium</i> sp	Laird, 1952 Hawkey et al., 1989 Keymer et al., 2001 Keymer et al., 2001 Keymer et al., 2001 Schultz; Petersen, 2003 Dehrhard et al., 2011a Dehrhard et al., 2011b Quilfeldt et al., 2010 Dindpl et al., 2011
<i>Eudyptes chrysolophus</i> Heard Is. [1985] Marion Is. [2001] → Washington, DC, USA	TBS [12] TBS [89] TBS+EI	Negative Negative <i>P. elongatum</i>	Jones, 1988 Schultz; Petersen, 2003 Herman et al., 1974

Species and location [period of sample collection]	Diagnostic method number of wild individuals tested]	Parasites recorded [number of wild individuals positive]	References
→ Washington, DC, USA → Bristol, England → England → England	TBS+EI TBS HP TBS	<i>P. relictum</i> <i>Plasmodium</i> sp <i>Plasmodium</i> sp <i>L. tawaki</i>	Herman et al., 1974 Redrobe, 2000 Peirce et al., 2005 Peirce et al., 2005
<i>Eudiptes moseleyi</i> Gough Is. [1929] → Bristol, England	TBS [5] TBS	<i>P. relictum</i> [1] <i>Plasmodium</i> sp	Fantham; Porter, 1944 Redrobe, 2000
<i>Eudiptes pachyrhynchus</i> Kakoura, South Is., New Zealand [1975] Jackson Head, South Is., New Zealand [1975] Jackson Head, South Is., New Zealand [1976-1977] → Murwai Beach, North Is., New Zealand	TBS [1] TBS [17] TBS [86] TBS+HP+PCR _L	<i>L. tawaki</i> [1] <i>L. tawaki</i> [16] <i>L. tawaki</i> [59] <i>L. tawaki</i>	Fallis et al., 1976 Fallis et al., 1976 Allison et al., 1978 Harvey; Alley, 2008; Hill, 2008
<i>Eudiptes robustus</i> Snarres Is. [1947] Snarres Is. [1975]	TBS [28] TBS [25]	<i>P. relictum</i> [3] Negative	Laird, 1950 Fallis et al., 1976
<i>Eudiptes schlegeli</i> Macquarie Is. [1950] Macquarie Is. [1980] Macquarie Is. [1982]	TBS [40] TBS [46] TBS [28]	Negative Negative Negative	Laird, 1952 Jones, 1988 Jones, 1988
<i>Eudiptes sclateri</i> Snarres Is. [1975] Otago Peninsula, South Is., New Zealand [1990]	TBS [1] HP [1]	Negative Negative	Fallis et al., 1976 Gill; Darby, 1993
<i>Eudiptes</i> sp (either <i>E. chrysocome</i> or <i>E. moseleyi</i>) → Berlin, Germany → Honolulu, Hawaii, USA	TIS+HP TBS	<i>Plasmodium</i> sp <i>P. relictum</i>	Raethel, 1960 Laird; Van Riper, 1981
<i>Eudiptula minor</i> Trio Is., New Zealand [1948] Northland, North Is., New Zealand [1973-1974] Jackson Head, South Is., New Zealand [1977] Montague Is., NSW, Australia [1977]	TBS [1] HP [ns] TBS [1] TBS [18]	Negative Negative Negative Negative	Laird, 1950 Crockett; Kearns, 1975 Allison et al., 1978 Myktyowycz; Hesterman, 1957

Species and location [period of sample collection]	Diagnostic method number of wild individuals tested]	Parasites recorded [number of wild individuals positive]	References
Multiple locations, VIC, Australia [1977-1978]	HP [48]	Negative	Obendorf, McColl, 1980
Marion Bay and Little Spectacle Is., TAS, Australia [1986]	TBS [57]	<i>T. euclyptulae</i> [9]	Jones; Woehler, 1989
Unspecified location, NSW, Australia [1990]	TBS [ns]	<i>Babesia</i> sp [1]	Cunningham et al., 1993
Lion Is., NSW, Australia [1991-1992]	TBS [168]	<i>Babesia</i> sp [8]	Cunningham et al., 1993
Bowen Is., NSW, Australia [1991-1992]	TBS [126]	<i>Babesia</i> sp [2]	Cunningham et al., 1993
Lion Is., NSW, Australia [1992-1993]	TBS [20]	Negative	Cunningham et al., 1993
Bowen Is., NSW, Australia [1992-1993]	TBS [20]	Negative	Cunningham et al., 1993
Penguin Is., WA, Australia [1992]	TBS [30]	Negative	Jones; Shellam, 1999a
Low Head, TAS, Australia [1995]	TBS [70]	Negative	Jones; Shellam, 1999a
Phillip Is., VIC, Australia [2005-2006]	TBS [268] ^A	Negative	Mortimer, Lill, 2007
Tiriti Matangi Is., New Zealand [2006-2007]	PCR _{HP} +PCR _L [109]	Negative	Van Rensburg, 2010
Tiriti Matangi Is., New Zealand [2006-2007]	TBS+PCR _{HP} +PCR _L [79]	<i>P. (Haemamoeba)</i> sp [1], Undetermined [9]	Van Rensburg, 2010
Tiriti Matangi Is., New Zealand [2006-2007]	HP [84]	Undetermined [3]	Van Rensburg, 2010
Penguin Is., WA, Australia [2006-2012]	TBS+PCR _{HP} +HP [ns]	Undetermined [10]	Cannell et al., 2013
→ San Diego, California, USA	TBS+HP	<i>P. relictum</i>	Giner; Sheridan, 1967
→ Experimental conditions	TBS	<i>L. tawaki</i>	Allison et al., 1978
Megadyptes antipodes			
Fouveau Strait, New Zealand [1929]	TBS [10]	<i>P. relictum</i> [1]	Fantham; Porter, 1944
Campbell Is. [1948]	TBS [2]	<i>P. relictum</i> [1]	Laird, 1950
Otago Peninsula, South Is., New Zealand [1990]	HP [12]	Negative	Gilt; Darby, 1993
Otago Peninsula, South Is., New Zealand [1997-1999]	TBS [51]	Negative	McDonald, 2012
Otago Peninsula, South Is., New Zealand [1997-1999]	TBS+PCR _{HP} [12]	Undetermined [12]	McDonald, 2012
Otago Peninsula, South Is., New Zealand [1997-1999]	TBS+PCR _{HP} [20]	Undetermined [6]	McDonald, 2012
Otago Peninsula, South Is., New Zealand [2001-2002]	PCR _{HP} [143]	Negative	Sturrock; Tompkins, 2007
Codfish and Stewart Is., New Zealand [2005-2008]	HP+SEM [45]	<i>Leucocytozoon</i> sp [12]	Alley et al., 2005; Hill, 2008
Stewart Is., New Zealand [2006-2007]	TBS [2]	Negative	Hill et al., 2010
Stewart Is., New Zealand [2006-2007]	TBS+PCR _L [12]	<i>Leucocytozoon</i> sp [10]	Hill et al., 2010
Stewart Is., New Zealand [2006-2007]	HP [14]	<i>Leucocytozoon</i> sp [2]	Hill et al., 2010
Stewart Is., New Zealand [2006-2007]	HP+PCR _L [7]	<i>Leucocytozoon</i> sp [7]	Hill et al., 2010
Catkins, South Is., New Zealand [2006-2007]	TBS [18]	Negative	Hill et al., 2010
Catkins, South Is., New Zealand [2006-2007]	PCR _L [13]	Negative	Hill et al., 2010
Catkins, South Is., New Zealand [2006-2007]	TBS+PCR _L [17]	Negative	Hill et al., 2010

Species and location [period of sample collection]	Diagnostic method number of wild individuals tested]	Parasites recorded [number of wild individuals positive]	References
Oamaru, South Is., New Zealand [2006-2007] Otago Peninsula, South Is., New Zealand [2006-2007] Multiple locations, South Is., New Zealand [2008] Multiple locations, South Is., New Zealand [2008] Campbell Is. [2006-2007] Enderby Is., Auckland Is. [2006-2007] Enderby Is., Auckland Is. [2008-2009] Enderby Is., Auckland Is. [2008-2009]	PCR _L [32] PCR _L [33] HP [88] HP+PCR _L [27] PCR _L [19] PCR _L [19] TBS+PCR _L [96] HP+PCR _L [19]	Negative Negative Negative <i>Leucocytozoon</i> sp [3] <i>Leucocytozoon</i> sp [4] <i>Leucocytozoon</i> sp [14] <i>Leucocytozoon</i> sp [62] <i>Leucocytozoon</i> sp [14]	Hill et al., 2010 Hill et al., 2010 Argilla et al., 2013 Argilla et al., 2013 Argilla et al., 2013 Argilla et al., 2013 Argilla et al., 2013 Argilla et al., 2013
<i>Pygoscelis adeliae</i>			
Cape Royd, Ross Is., Antarctica [1957] Victoria Land, Antarctica [1964-1966] King George Is., South Shetlands [1978] Ardley Is., South Shetlands [1983] Magnetic Is., Princess Elizabeth Land, Antarctica [1991] Béchevaise Is., Kemp Land, Antarctica [1995] Torgersen Is., Antarctic Peninsula [1996-1997] King George Is., South Shetlands [2010-2011]	TBS [94] TBS [18] TBS [24] ^A TBS [4] ^A HP [1] TBS [26] TBS [105] ^A TBS+PCR _{R+P} [2]	Negative Negative Negative Negative Negative Negative Negative Negative	Laird, 1961 Becker; Holloway, 1968 Myrcha; Kostecka-Myrcha, 1980 Zinsmeister; VanDerHeyden, 1987 McFarlane, 1996 Jones; Shellam, 1999a Vleck et al., 2000 Vanstreels et al., 2014
<i>Pygoscelis antarcticus</i>			
King George Is., South Shetlands [1978] Elsehul, South Georgia Is. [1975-1978] Ardley Is., South Georgia Is. [1983] Deception Is., South Shetlands [1994-1995] Deception Is., South Shetlands [1996-1997] King George Is., South Shetlands [2010-2011] King George Is., South Shetlands [2010-2011] → Antwerp, Belgium	TBS [21] ^A TBS [1] TBS [2] ^A TBS [98] TBS [60] ^A TBS [1] TBS+PCR _{R+P} [17] TBS+TIS+HP	Negative Negative Negative Negative Negative Negative Negative <i>P. relicturn</i>	Myrcha; Kostecka-Myrcha, 1980 Peirce; Prince, 1980 Zinsmeister; VanDerHeyden, 1987 Merino et al., 1997 Moreno et al., 1998 Vanstreels et al., 2014 Vanstreels et al., 2014 Rodhain; Adrienne, 1952
<i>Pygoscelis papua</i>			
Macquarie Is. [1950] King George Is., South Shetlands [1978] Ardley Is., South Shetlands [1983] Macquarie Is. [1982] Falkland/Malvinas Is. [1986-1987]	TBS [22] TBS [20] ^A TBS [6] ^A TBS [15] TBS [19] ^A	Negative Negative Negative Negative Negative	Laird, 1952 Myrcha; Kostecka-Myrcha, 1980 Zinsmeister; VanDerHeyden, 1987 Jones, 1988 Hawkey et al., 1989

Species and location [period of sample collection]	Diagnostic method number of wild individuals tested]	Parasites recorded [number of wild individuals positive]	References
Falkland/Malvinas Is. [1987] New Island, Falkland/Malvinas Is. [2008-2009] King George Is., South Shetlands [2010-2011] King George Is., South Shetlands [2010-2011] Gabriel G. Videla Base, Antarctic Peninsula [2011-2012] Bernardo O'Higgins Base, Antarctic Peninsula [2011-2012] Ardley Is., South Shetlands [2011-2012] Elsehul, South Georgia Is. [1975-1978] → San Diego, California, USA → Bristol, England	TBS+HP [20] TBS+PCR _{HP} +PCR _L [15] TBS [25] TBS+PCR _{HP} [19] TBS [100] TBS [100] TBS [100] TBS [50] TBS+HP TBS	Negative Negative Negative Negative Negative Negative Negative Negative <i>P. relatum</i> <i>Plasmodium</i> sp	Keymer et al., 2001 Quilfeldt et al., 2010 Vanstreels et al., 2014 Vanstreels et al., 2014 González-Acuña et al., 2013 González-Acuña et al., 2013 González-Acuña et al., 2013 Peirce; Prince, 1980 Griner; Sheridan, 1967 Redrobe, 2000
<i>Spheniscus demersus</i> Dassen Is., South Africa [1938] Saldanha Bay, South Africa [1927] Saldanha Bay, South Africa [1927-1929] Multiple locations, South Africa [1990] Multiple locations, South Africa [1992-1999] → Antwerp, Belgium → Vienna, Austria → San Diego, California, USA → Baltimore, Maryland, USA → Baltimore, Maryland, USA → Baltimore, Maryland, USA → Cape Town, South Africa → Cape Town, South Africa → Cape Town, South Africa → Cape Town, South Africa → Cape Town, South Africa → Cape Town, South Africa	TBS [4] TBS+TIS+HP [1] TBS [33] TBS [21] TBS [800] TBS+TIS+HP+EI TBS+HP TBS+HP TBS+TIS+HP+EI TBS+TIS+HP+EI TBS+TIS+HP+EI TBS TBS TBS+TIS+HP TBS+PCR _{HP} TBS+PCR ₉₀ TBS+PCR ₉₀	<i>Babesia</i> sp [1], <i>Borrelia</i> sp [1] <i>P. relatum</i> [1] <i>P. relatum</i> [1] Negative <i>Babesia</i> sp [ns] <i>P. relatum</i> <i>P. relatum</i> <i>P. relatum</i> <i>P. elongatum</i> <i>P. relatum</i> <i>P. elongatum</i> + <i>P. relatum</i> <i>L. tawaki</i> <i>B. peircei</i> <i>Plasmodium</i> sp <i>P. juxtanucleare</i> <i>Borrelia</i> sp <i>Babesia</i> sp + <i>Borrelia</i> sp	Coles, 1941; Bennett et al., 1992 Fantham; Porter, 1944 Fantham; Porter, 1944 Brossy, 1992 Brossy, 1993; Brossy et al., 1999 Rodhain, 1939 Grünberg; Kutzer, 1963 Griner; Sheridan, 1967 Several publications ^B Several publications ^B Several publications ^B Earlé et al., 1992 Brossy, 1992; Earlé et al., 1993 Brossy et al., 1999; Parsons; Underhill, 2005 Grim et al., 2003 Yabsley et al., 2012 Yabsley et al., 2012
<i>Spheniscus humboldti</i> Pájaros Niños Is. Valparaíso, Chile [1992]	TBS [30]	Negative	Wallace et al., 1995

Species and location [period of sample collection]	Diagnostic method number of wild individuals tested]	Parasites recorded [number of wild individuals positive]	References
Cachagua Is., Valparaíso, Chile [1992]	TBS [21]	Negative	Wallace et al., 1995
Cachagua Is., Valparaíso, Chile [1993]	TBS [18]	Negative	Jones; Shellam, 1999
→ Antwerp, Belgium	TBS+TIS+HP+EI	<i>P. relicta</i>	Rodhain, 1939
→ Washington, DC, USA	TBS+EI	<i>P. elongatum</i> + <i>Plasmodium</i> sp	Huff, Shiroishi, 1962
→ Vienna, Austria	TBS+HP	<i>P. relicta</i>	Grünberg; Kutzer, 1963
→ San Diego, California, USA	TBS+HP	<i>P. relicta</i>	Griner; Sheridan, 1967
→ Yongin, South Korea	TBS+HP	<i>P. relicta</i>	Bak et al., 1984
→ Kanagawa, Japan	PCR _{HP}	<i>Plasmodium</i> sp	Ejiri et al., 2009
→ Vienna, Austria	TBS+PCR _{HP} +ISH	<i>P. elongatum</i>	Dindpl et al., 2011
→ Vienna, Austria	TBS+PCR _{HP} +ISH	<i>Plasmodium</i> sp	Dindpl et al., 2011
Spheniscus magellanicus			
Falkland/Malvinas Is. [1986-1987]	TBS [12] ^A	Negative	Hawkey et al., 1989
Falkland/Malvinas Is. [1987]	TBS+HP [12]	Negative	Keymer et al., 2001
Chubut, Argentina [1998-2001]	TBS [336]	Negative	Jovani et al., 2001; Tella et al., 2001
Vernad Norte Is., Chubut, Argentina [1999-2000]	TBS [103] ^A	Negative	Moreno et al., 2002
Playa Grande de Queule, Araucanía, Chile [2009]	HP [16]	Negative	Schlatter et al., 2009
New Island, Falkland/Malvinas Is. [2008-2009]	TBS+PCR _{HP} +PCR _L [18]	Negative	Quilfeldt et al., 2010
→ Des Moines, Iowa, USA	TBS+TIS+HP+SEM	<i>P. relicta</i>	Fix et al., 1988
→ San Francisco, California, USA	TBS	<i>Plasmodium</i> sp	Tolini et al., 2000
→ Jeju Is., South Korea	HP+PCR _{HP}	<i>Plasmodium</i> sp	Ko et al., 2008
→ Valdivia, Los Ríos, Chile	TBS+HP	<i>P. relicta</i>	Carvajal; Alvarado, 2009
→ São Paulo, São Paulo, Brazil	TBS+PCR _{HP} +HP	<i>P. elongatum</i>	Bueno et al., 2010; Vanstreels et al., in press
→ São Paulo, São Paulo, Brazil	TBS+PCR _{HP} +HP	<i>P. (Haemamoeba)</i> sp	Bueno et al., 2010; Vanstreels et al., in press
→ Florianópolis, Santa Catarina, Brazil	TBS+PCR _{HP} +HP	<i>Haemaphysalis</i> sp	Vanstreels et al., in press
→ Florianópolis, Santa Catarina, Brazil	TBS+PCR _{HP} +HP	<i>P. tejerai</i>	Silveira et al., 2013; Vanstreels et al., in press, in prep.
→ Florianópolis, Santa Catarina, Brazil	TBS+PCR _{HP} +HP	<i>P. elongatum</i>	Vanstreels et al., in press, in prep
→ Cariacá, Espírito Santo, Brazil	TBS+PCR _{HP} +HP	<i>P. elongatum</i>	Vanstreels et al., in press, in prep
→ Florianópolis, Santa Catarina, Brazil	TBS+PCR _{HP} +HP	<i>P. cathemerium</i>	Vanstreels et al., in press, in prep
→ Cariacá, Espírito Santo, Brazil	TBS+PCR _{HP} +HP	<i>P. cathemerium</i>	Vanstreels et al., in prep.
→ Salvador, Bahia, Brazil	TBS+PCR _{HP} +HP	<i>P. cathemerium</i>	Vanstreels et al., in prep.

Species and location [period of sample collection]	Diagnostic method number of wild individuals tested]	Parasites recorded [number of wild individuals positive]	References
→ Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil → Salvador, Bahia, Brazil → Florianópolis, Santa Catarina, Brazil → Salvador, Bahia, Brazil → Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	TBS+PCR _{HP} +HP TBS+PCR _{HP} +HP TBS+PCR _{HP} +HP TBS+PCR _{HP} +HP TBS+PCR _{HP} +HP	<i>P. nucleophilum</i> <i>P. nucleophilum</i> <i>Plasmodium</i> sp <i>Plasmodium</i> sp <i>Plasmodium</i> sp	Vanstreels et al., in prep. Vanstreels et al., in prep. Vanstreels et al., in press, in prep. Vanstreels et al., in prep. Vanstreels et al., in prep.
Spheniscus mendiculus Unspecified location, Galápagos [ns]	TBS [ns]	Microfilariae [ns]	Harmon et al., 1985 <i>apud</i> Merkel et al., 2007
Multiple locations, Galápagos [1996] Fernandina Is., Galápagos [2003-2005]	PCR _{HP} [94] TBS [29] ^C	Negative Microfilariae [8]	Miller et al., 2001 Travis et al., 2006; Merkel et al., 2007; Siers et al., 2010
Fernandina Is., Galápagos [2003-2005] Isabela Is., Galápagos [2003-2005]	PCR _{HP} [40] ^C TBS [269] ^D	<i>Plasmodium</i> sp [1] Microfilariae [35]	Parker et al., 2006; Levin et al., 2009 Travis et al., 2006; Merkel et al., 2007; Siers et al., 2010
Isabela Is., Galápagos [2003-2005]	PCR _{HP} [242] ^D	<i>Haemoproteus</i> sp [1], <i>Plasmodium</i> sp [13]	Parker et al., 2006; Levin et al., 2009
Las Marietas Is., Galápagos [2003-2005] Bartolomé Is., Galápagos [2003-2005] Floreana Is., Galápagos [2003-2005] Santiago Is., Galápagos [2003-2005] Bartolomé Is., Galápagos [2008-2009] Fernandina Is., Galápagos [2003-2005] Isabela Is., Galápagos [2003-2005]	PCR _{HP} [94] ^D PCR _{HP} [14] PCR _{HP} [3] PCR _{HP} [1] TBS+PCR _{HP} [5] TBS+PCR _{HP} [71] TBS+PCR _{HP} [131]	<i>Plasmodium</i> sp [2] <i>Plasmodium</i> sp [2] Negative Negative Negative <i>Plasmodium</i> sp [5] <i>Plasmodium</i> sp [8]	Parker et al., 2006; Levin et al., 2009 Parker et al., 2006; Levin et al., 2009 Parker et al., 2006; Levin et al., 2009 Parker et al., 2006; Levin et al., 2009 Levin et al., 2013 Levin et al., 2013 Levin et al., 2013

Legend: TBS = thin blood smears, HP = histopathology, TIS = tissue impression smears, PCR = polymerase chain reaction (subscript letter indicate reaction target: PCR_{HP} = *Haemoproteus/Plasmodium*, PCR_L = *Leucocytozoon*, PCR_{Bo} = *Borrelia*), EI = experimental inoculation of domestic birds, SEM = scanning electron microscopy, ISH = *in-situ* hybridization; ns = not specified. Obs.: ^A = Study did not specifically aim the detection of blood parasites, therefore sub-optimal protocols of blood smear examination may have been employed; ^B = Fleischman et al., 1968a, 1968b; Herman et al., 1968; Sladen et al., 1979; Stoskopf; Beier, 1979; Beier; Stoskopf, 1980; Beier; Trpis, 1981; Cranfield et al., 1994; Graczyk et al., 1994a, 1994b, 1995; McConkey et al., 1996; Grim et al., 2004; ^C and ^D = Overlapping sampling efforts.

Appendix B - Serological studies targeting antibodies against blood parasites in penguins. Records at *ex-situ* locations are indicated by an arrow and italics

Species and location [period of sample collection]	Diagnostic method [number of wild individuals tested]	Test antigen [number of wild individuals positive]	References
<i>Aptenodytes patagonicus</i> Kerguelen and Crozet Is. [ns] Possession Is. [1996-1998] (randomly-sampled adults) Possession Is. [1996-1998] (tick-infested adults) Possession Is. [1996-1998] (one year-old chicks)	ELISA [12] PHA [97] PHA [37] PHA [63]	<i>P. falciparum</i> R32tet _{co} +P.F.R27 [7] <i>B. burgdorferi</i> sensu lato [1] <i>B. burgdorferi</i> sensu lato [5] <i>B. burgdorferi</i> sensu lato [4]	Graczyk et al., 1995c Gauthier-Clerc et al., 1999 Gauthier-Clerc et al., 1999 Gauthier-Clerc et al., 1999
<i>Eudyptula minor</i> Codfish Is., New Zealand [1989-1994] → Napier, North Is., New Zealand (permanently captive)	ELISA [8] ELISA [12]	<i>P. falciparum</i> R32tet _{co} [5] <i>P. falciparum</i> R32tet _{co} +P.F.R27 [7]	Graczyk et al., 1995b Graczyk et al., 1995c
<i>Megadyptes antipodes</i> Codfish Is., New Zealand [1989-1994] Cattlins, South Is., New Zealand [1989-1994] Campbell Is. [1989-1994] South Is., New Zealand [1989-1994] Enderby Is., Auckland Is. [1989-1994] Banks Peninsula, South Is., New Zealand [1989-1994] Otago Peninsula, South Is., New Zealand [1990] Dunedin, South Is., New Zealand [ns] Otago Peninsula, South Is., New Zealand [1997-1999]	ELISA [32] ELISA [24] ELISA [22] ELISA [20] ELISA [20] ELISA [16] ELISA [11] ELISA [5] ELISA [80]	<i>P. falciparum</i> R32tet _{co} [29] <i>P. falciparum</i> R32tet _{co} [19] <i>P. falciparum</i> R32tet _{co} [5] <i>P. falciparum</i> R32tet _{co} [11] <i>P. falciparum</i> R32tet _{co} [13] <i>P. falciparum</i> R32tet _{co} [13] <i>P. falciparum</i> R32tet _{co} [9] <i>P. falciparum</i> R32tet _{co} +P.F.R27 [5] <i>P. relictum</i> CRBCE [78]	Graczyk et al., 1995b Graczyk et al., 1995b Graczyk et al., 1995b Graczyk et al., 1995b Graczyk et al., 1995b Graczyk et al., 1995b Graczyk et al., 1995b Graczyk et al., 1995c McDonald, 2012
<i>Pygoscelis adeliae</i> Cape Birds, Ross Is., Antarctica [ns]	ELISA [5]	<i>P. falciparum</i> R32tet _{co} +P.F.R27 [0]	Graczyk et al., 1995c
<i>Pygoscelis papua</i> Kerguelen and Crozet Is. [ns]	ELISA [12]	<i>P. falciparum</i> R32tet _{co} +P.F.R27 [4]	Graczyk et al., 1995c

Species and location [period of sample collection]	Diagnostic method [number of wild individuals tested]	Test antigen [number of wild individuals positive]	References
<i>Spheniscus demersus</i>			
Robben Is., South Africa [1993-1994]	ELISA [46]	<i>P. falciparum</i> R32tet ₃₂ [16]	Graczyk et al., 1995a
Dassen Is., South Africa [1993-1994]	ELISA [30]	<i>P. falciparum</i> R32tet ₃₂ [10]	Graczyk et al., 1995a
Simon's Town, South Africa [1993-1994]	ELISA [34]	<i>P. falciparum</i> R32tet ₃₂ [10]	Graczyk et al., 1995a
Simon's Town, South Africa [ns]	ELISA [44]	<i>P. falciparum</i> R32tet ₃₂ +P.F.R27 [23]	Graczyk et al., 1995c
Robben Is., South Africa [1993-1994]	ELISA [46]	<i>B. peircei</i> CRBCE [29]	Graczyk et al., 1995c
Dassen Is., South Africa [1993-1994]	ELISA [30]	<i>B. peircei</i> CRBCE [18]	Graczyk et al., 1996
Simon's Town, South Africa [1993-1994]	ELISA [34]	<i>B. peircei</i> CRBCE [22]	Graczyk et al., 1996
→ Cape Town, South Africa (oiled, recently admitted)	ELISA [45]	<i>P. falciparum</i> R32tet ₃₂ [28]	Graczyk et al., 1995a
→ Cape Town, South Africa (oiled, admitted ≥2 weeks)	ELISA [21]	<i>P. falciparum</i> R32tet ₃₂ [8]	Graczyk et al., 1995a
→ Cape Town, South Africa (permanently captive)	ELISA [15]	<i>P. falciparum</i> R32tet ₃₂ [3]	Graczyk et al., 1995a
→ Cape Town, South Africa (oiled, recently admitted)	ELISA [66]	<i>B. peircei</i> CRBCE [47]	Graczyk et al., 1996
→ Cape Town, South Africa (permanently captive)	ELISA [15]	<i>B. peircei</i> CRBCE [9]	Graczyk et al., 1996
<i>Spheniscus magellanicus</i>			
→ San Diego, California, USA (permanently captive)	ELISA [7]	<i>P. falciparum</i> R32tet ₃₂ +P.F.R27 [3]	Graczyk et al., 1995c
<i>Spheniscus mendiculus</i>			
Punta Espinosa, Fernandina Is., Galápagos [2008-2009]	ELISA [28]	<i>P. vivax</i> Genscript CSP [28]	Palmer et al., 2013
Cabo Douglas, Fernandina Is., Galápagos [2008-2009]	ELISA [5]	<i>P. vivax</i> Genscript CSP [5]	Palmer et al., 2013
Fondeadero Mangle, Fernandina Is., Galápagos [2008-2009]	ELISA [37]	<i>P. vivax</i> Genscript CSP [37]	Palmer et al., 2013
El Muñeco, Isabela Is., Galápagos [2008-2009]	ELISA [16]	<i>P. vivax</i> Genscript CSP [15]	Palmer et al., 2013
Canones Sur, Isabela Is., Galápagos [2008-2009]	ELISA [15]	<i>P. vivax</i> Genscript CSP [15]	Palmer et al., 2013
Calela Iguala, Isabela Is., Galápagos [2008-2009]	ELISA [30]	<i>P. vivax</i> Genscript CSP [29]	Palmer et al., 2013
Puerto Villamil, Isabela Is., Galápagos [2008-2009]	ELISA [16]	<i>P. vivax</i> Genscript CSP [16]	Palmer et al., 2013
Las Marietas Is., Galápagos [2008-2009]	ELISA [34]	<i>P. vivax</i> Genscript CSP [31]	Palmer et al., 2013

Legend: PHA = passive hemagglutination, ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; ns = not specified.

5 OUTBREAK OF AVIAN MALARIA ASSOCIATED TO MULTIPLE SPECIES OF *PLASMODIUM* IN MAGELLANIC PENGUINS UNDERGOING REHABILITATION IN SOUTHERN BRAZIL

5.1 ABSTRACT

Avian malaria is a mosquito-borne disease caused by *Plasmodium* spp. Avian plasmodia are recognized conservation-threatening pathogens due to their potential to cause severe epizootics when introduced to bird populations with which they did not co-evolve. Penguins are considered particularly susceptible, as outbreaks in captive populations will often lead to high morbidity and rapid mortality. We used a multidisciplinary approach to investigate an outbreak of avian malaria in 28 Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) at a rehabilitation center during summer 2009 in Florianópolis, Brazil. Hemosporidian infections were identified by microscopic and molecular characterization in 64% (18/28) of the penguins, including *Plasmodium* (*Haemamoeba*) *tejerai*, *Plasmodium* (*Huffia*) *elongatum*, a *Plasmodium* (*Haemamoeba*) sp. lineage closely related to *Plasmodium cathemerium*, and a *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) sp. lineage closely related to *Haemoproteus syrnii*. *P. tejerai* played a predominant role in the studied outbreak and was identified in 72% (13/18) of the hemosporidian-infected penguins, and in 89% (8/9) of the penguins that died, suggesting that this is a highly pathogenic parasite for penguins; a detailed description of tissue meronts and lesions is provided. Mixed infections were identified in three penguins, and involved *P. elongatum* and either *P. tejerai* or *P. (Haemamoeba)* sp. that were compatible with *P. tejerai* but could not be confirmed. In total, 32% (9/28) penguins died over the course of 16 days despite oral treatment with chloroquine followed by sulfadiazine-trimethoprim. Hemosporidian infections were considered likely to have occurred during rehabilitation, probably from mosquitoes infected while feeding on local native birds, whereas penguin-mosquito-penguin transmission may have played a role in later stages of the outbreak. Considering the seasonality of the infection, rehabilitation

centers would benefit from narrowing their efforts to prevent avian malaria outbreaks to the penguins that are maintained throughout summer.

5.2 INTRODUCTION

Plasmodium spp. are recognized as pathogens that may threaten the conservation of avian communities, particularly when introduced to populations that did not co-evolve with the parasite (BEADELL et al., 2006; ATKINSON; LAPOINTE, 2009). In particular, two avian taxa have been shown to be highly susceptible to these parasites, Hawaiian honeycreepers (Drepaniidae) and penguins (Spheniscidae) (FIX et al., 1988; JONES; SHELLAM, 1999b; ATKINSON et al., 2001). Concerns that this pathogen may be a significant conservation threat for penguins have been raised due to the observation that avian malaria in captive penguins produces rapid and severe outbreaks with as much as 50-80% mortality within few weeks (RODHAIN, 1939; GRINER; SHERIDAN, 1967; FIX et al., 1988; BUENO et al., 2010). Four species of *Plasmodium* sp. have been demonstrated to infect penguins: *P. (Haemamoeba) relictum* (FANTHAM; PORTER, 1944), *P. (Huffia) elongatum* (HUFF; SHIROISHI, 1962), *P. (Bennettinia) juxtannucleare* (GRIM et al., 2003) and *P. (Haemamoeba) tejerai* (SILVEIRA et al., 2013). Additionally, there is an anecdotal report of *P. (Haemamoeba) cathemerium* in penguins (LUERA-CARBO, 1965).

Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) are native to Argentina, Chile and the Falkland Islands, and often winter along the coast of Uruguay and Brazil (GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2006, 2010). The susceptibility of this species to malarial parasites has been documented in zoos and rehabilitation centers (FIX et al., 1988; KO et al., 2008; BUENO et al., 2010; SILVEIRA et al., 2013), but not in the wild (HAWKEY et al., 1989; JOVANI et al., 2001; KEYMER et al., 2001; QUILLFELDT et al., 2010). Other studies have failed to detect *Plasmodium* sp. in wild penguins elsewhere in South America or at the Falkland islands, whether in Southern rockhopper (*Eudyptes chrysocome*) (HAWKEY et al., 1989; KARESH et al., 1999; KEYMER et al., 2001;

QUILLFELDT et al., 2010), Humboldt (*S. humboldti*) (WALLACE et al., 1995; JONES; SHELLAM, 1999a; MILLER et al., 2001; SMITH et al., 2008) or Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) (HAWKEY et al., 1989; KEYMER et al., 2001; QUILLFELDT et al., 2010). In Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*), on the other hand, DNA from *Plasmodium* spp. has been detected at the Galapagos Archipelago, even though the parasite was not observed in blood smears (LEVIN et al., 2009, 2013).

We had previously reported two Magellanic penguins that died due to infection by *P. tejerai* during a mortality outbreak at a rehabilitation center in Florianópolis, Brazil, in early 2009 (SILVEIRA et al., 2013). In the present paper we follow up on that investigation and provide a broader study on the epidemiology and pathology of *P. tejerai* as well as other hemosporidians involved in the same outbreak. We also discuss the implications of these findings for the rehabilitation and conservation of penguins and other highly susceptible taxa.

5.3 METHODS

5.3.1 Ethics statement

This study was conducted under approval by the Animal Use Ethics Committee of the University of São Paulo (CEUA-USP 1757/2009) and was authorized by the Brazilian wildlife authority (SISBIO 20825-3).

5.3.2 Study population, sample collection and treatment

We examined the Magellanic penguins maintained through austral summer 2008-2009 at the Centro de Triagem de Animais Silvestres do Núcleo de Fauna do IBAMA,

Florianópolis, Brazil (27°31'35"S 48°25'44"W). The rehabilitation center is located near a large freshwater lake (Lagoa da Conceição) and is surrounded by Atlantic forest (lowland tropical moist forest), with average annual precipitation of 1524 mm and average annual temperature ranging from 17.0 to 24.8 °C (RAMOS et al., 2009).

The year 2008 was atypical in presenting unusually high numbers of Magellanic penguins becoming beach-cast along the Brazilian coast (GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2010), and the rehabilitation center received 387 animals. Most penguins were successfully rehabilitated (following protocols by SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2007) and released in 2008, however 23 were maintained through summer, and another 5 were received in early 2009 (band numbers 508, 586, 587, 592 and 593); these 28 penguins were the subjects of this study (Table 5.1). In a previous study (SILVEIRA et al., 2013) we examined in detail two of these individuals (band numbers 506 and 520 are respectively penguins A and B in that study). Metatarsal blood samples were collected on 23/03/2009 (584, 593) and 25/03/2009 (remaining penguins) (Sampling A); penguins that were still alive were sampled again on 05/04/2009 (Sampling B).

Veterinarians monitored penguins daily throughout the rehabilitation process, and any clinical signs or abnormalities were recorded. After avian malaria was diagnosed, penguins were orally treated with chloroquine on 01/04/2009 (10 mg/kg at hour zero; 5 mg/kg at hours 6, 18 and 24) until 10/04/2009 (5 mg/kg q24h), then with sulfadiazine-trimethoprim (40 mg/kg q24h) from 11/04/2009 to 20/04/2009.

Table 5.1 - Individual history and diagnostic results for the studied Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). Taxonomic names within brackets indicate the taxon to which the species is presumed to correspond on the basis of phylogenetic analyses. Asterisks indicate individuals that died during the outbreak

Band no.	PCR (A)	PCR (B)	Phylogenetic group/lineage	Blood smear (A)	Blood smear (B)	Histo-pathology	Hemosporidian species
503*	-	Positive	A	<i>Plasmodium</i> sp.	<i>P. (Haemamoeba)</i> sp.	-	[<i>P. tejera</i>]
504	Positive	Negative	Seq. unsuccessful	Negative	Negative	-	Undetermined
506*	Positive	-	A	<i>P. tejera</i>	-	Positive	<i>P. tejera</i>
507	Positive	Negative	A	Negative	Negative	-	[<i>P. tejera</i>]
508*	Positive	Positive	A+C	<i>P. elongatum</i> + <i>P. (Haemamoeba)</i> sp.	<i>P. elongatum</i> + <i>P. tejera</i>	-	<i>P. elongatum</i> + <i>P. tejera</i>
509	-	Negative	-	Negative	Negative	-	-
510	-	Negative	-	-	Negative	-	-
511	Positive	Positive	A	-	Negative	-	[<i>P. tejera</i>]
512	Positive	Negative	A	Negative	Negative	-	[<i>P. tejera</i>]
513	-	Negative	-	Negative	Negative	-	-
514	-	Negative	-	Negative	Negative	-	-
515	-	Negative	-	Negative	Negative	-	-
516	-	Positive	B	Negative	<i>Plasmodium</i> sp.	-	-
517	-	Negative	-	<i>P. elongatum</i> + <i>P. (Haemamoeba)</i> sp.	Negative	-	[<i>P. (Haemamoeba)</i> sp.]
518*	Positive	-	A	-	Negative	-	<i>P. elongatum</i> + <i>P. (Haemamoeba)</i> sp.
520*	Positive	-	A	<i>P. tejera</i>	Negative	-	[<i>P. tejera</i>]
584*	-	-	-	<i>P. tejera</i>	-	Positive	[<i>P. tejera</i>]
585	-	Negative	-	Negative	Negative	-	-
586	-	Positive	D	Negative	Negative	-	[<i>H. (Parahaemoproteus)</i> sp.]
587*	-	-	-	Negative	-	-	-
588	Positive	Negative	Seq. unsuccessful	<i>P. elongatum</i> + <i>P. (Haemamoeba)</i> sp.	Negative	-	<i>P. elongatum</i> + <i>P. (Haemamoeba)</i> sp.
589*	Positive	Negative	A	Negative	Negative	-	[<i>P. tejera</i>]
590	Positive	-	A	-	<i>P. tejera</i>	-	<i>P. tejera</i>
592	-	Negative	-	Negative	Negative	-	-
593*	-	-	-	<i>P. tejera</i>	-	Positive	<i>P. tejera</i>
16437	Positive	Negative	A	Negative	Negative	-	[<i>P. tejera</i>]
16445	-	Negative	-	Negative	-	-	-
16682	-	-	-	-	Negative	-	-

5.3.3 Laboratory procedures

Two thin blood smears were performed immediately after each blood collection, dried at room temperature, and fixed with methanol. Two heparin capillaries were also collected immediately after collection. The remaining blood was stored in EDTA flasks and refrigerated (4°C) for 2-4 hours, centrifuged at 1500 G for 10 minutes, supernatant fluid was separated and both blood cells and plasma were frozen (-20°C). Packed Cell Volume (PCV) was determined through centrifugation in heparin capillaries at 16000 G for 5 min.

Blood smears were Giemsa-stained within a week of collection; at least 300 microscopic fields were examined for parasites in each smear, under 1000x magnification (>50.000 erythrocytes). Blood parasites were morphologically characterized (VALKIŪNAS, 2005) and quantified (GODFREY et al., 1987; GERING; ATKINSON, 2004); differential parasite counts (trophozoites, meronts, macrogametocytes and microgametocytes) were conducted for 100 parasites or for all parasites observed. Differential leukocyte counts (heterophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, monocytes) were conducted for 200 leukocytes per slide and Early Erythrocytic Lineage Cells (EELC) were estimated as a percentage of all red blood cells. Heterophil-to-Lymphocyte Ratio (HLR) was calculated. Blood smear examination was blind to PCR results and vice-versa.

Deceased animals were examined within 12 to 24h post-mortem, and organs and tissues were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Sections of 5 µm were obtained, stained with hematoxylin-eosin and examined under light microscopy.

5.3.4 Cytochrome b amplification and phylogenetic analysis

Frozen red blood cells in EDTA and frozen tissue samples were used for molecular analyses. DNA extraction was conducted using the DNEasy Blood and Tissue

Kit (#69506, Qiagen, Venlo, Netherlands) following the manufacturer's recommended protocol. DNA extraction was verified and quantified through UV spectrophotometry (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). A nested PCR targeting a 480 bp fragment of the cytochrome b (*cyt-b*) mitochondrial gene of *Haemoproteus* sp. and *Plasmodium* sp. was used (HELLGREN et al., 2004) (each reaction had 25 µL, with 75 ng of sample DNA; first reaction with primers HaemNFI and HaemNR3, second reaction with primers HaemF and HaemR2). GoTaq Green Master Mix (M7122, Promega, Madison, USA) was used for both reactions. Blood samples from chicken experimentally infected with *Plasmodium gallinaceum* or raised in arthropod-free environments were used as positive and negative controls, respectively. Amplification products were visualized in 6% silver nitrate-stained polyacrylamide gels and 2% agarose gel (SANGUINETTI et al., 1994; RIBEIRO et al., 2005).

PCR amplification products of positive samples were purified with Polyethylene glycol 8000. Bi-directional sequencing with dye-terminator fluorescent labeling was performed through automated sequencing (ABI Prism 3100, Applied Biosystems, Foster City, USA). Forward and reversed chromatograms were aligned and sequences were revised and edited using DNABaser (Heracle BioSoft SRL, Pitesti, Romania); *cyt-b* gene resulting sequences were deposited in the GenBank database (Appendix A). Phylogenetic relationships among the hemosporidian lineages identified in this study and related hemosporidian parasites were inferred by using *cyt-b* gene sequences from MalAvi database (BENSCH et al., 2009) for which morphospecies had been determined using blood smears (Appendix B). Because GenBank contains misidentified sequences of avian hemosporidians (VALKIŪNAS et al., 2008a), only lineages for which extensive blood smear morphology data was available were included when BLAST search indicated high identity and query cover ($\geq 95\%$) with the sequences obtained in this study (RICKLEFS; FALLON, 2002; ISHAK et al., 2008; CHAGAS et al., 2013; KARADJIAN et al., 2013; YILDIRIM et al., 2013). In addition, we included hemosporidian lineages recovered from penguins at the Galapagos Archipelago (LEVIN et al., 2009, 2013), São Paulo Zoological Park (BUENO et al., 2010) and Australia (CANNELL et al., 2013). Sequences were aligned using ClustalW (THOMPSON et al., 1997) as implemented in MEGA 5.2.2 (TAMURA et al., 2011). A maximum likelihood phylogenetic

tree for the parasite sequences was produced using MEGA 5.2.2 with the GTR + gamma model of nucleotide evolution, as selected using ModelTest (POSADA; CRANDALL, 1998), and 1000 bootstrap replications. There is on-going debate on which taxon should be used to root phylogenetic trees of hemosporidians (OUTLAW; RICKLEFS, 2011), we used *L. schoutedeni* merely for visualization purposes.

5.3.5 Statistical analyses

Two-sample t-tests were used to compare parasitemia and hematological parameters in the blood smears of penguins that were deceased and those that survived. Paired t-tests were used to compare hematological parameters (heterophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, monocytes, EELC, HLR, PCV) between positive and negative individuals and between Sampling A and B, and mean difference tests were used to determine whether these sampling date differences followed distinct patterns between positive or negative individuals. Linear regression was used to determine whether correlations existed between parasitemia and hematological parameters. ANOVA was used to compare the percentage of parasite forms (trophozoites, meronts, macrogametocytes, microgametocytes) in the blood smears of penguins infected by different parasite lineages. Fisher's exact test was used to compare mortality between individuals infected with *P. tejeraei* and other lineages. Significance level was 0.05 for all tests, and the Dunn-Šidák correction was applied for multiple comparisons.

5.4 RESULTS

5.4.1 Clinical signs and necropsy findings

In early March 2009, 28 Magellanic penguins were at the rehabilitation center, and were considered clinically healthy. Penguins died on 23/03/2009 (band numbers 584 and 593), 27/03/2009 (506), 29/03/2009 (518, 520, 589), 03/04/2009 (587), and 07/04/2009 (503, 508). All deceased penguins had good body condition, normal appetite and behavior on the days preceding their deaths, and shared similar necropsy findings: hydropericardium, cardiomegaly, lung congestion, hepatomegaly and splenomegaly.

5.4.2 Hemosporidian detection

Table 5.1 details PCR, blood smear, histopathology and gene sequencing results for the 28 penguins present at the rehabilitation center in April 2009. Eighteen penguins had one or more positive samples (64.3%; 18/28) whether through blood smears alone (50%; 2/4) or using a combination of blood smears and nested PCR (66.7%; 16/24). Of the 14 samples positive to PCR for which blood smears were also available, only 7 were identified as positive in the corresponding blood smears (50%). All PCR-negative samples were negative to parasites in the corresponding blood smears. No blood parasites other than hemosporidians were observed.

All twelve penguins tested by PCR at Sampling A were positive (100%). Nine of these PCR-positive penguins also had blood smears examined: 4 were positive (44.4%). An additional 14 penguins that had not been tested by PCR had blood smears examined at Sampling A, of which 4 were positive (28.6%). Five of the 20 penguins tested by PCR at Sampling B were positive (25%); of these, 3 had their blood smears identified as positive (60%). An additional 3 penguins that had not been tested by PCR had blood

smears examined at Sampling B, of which one was positive (33.3%). As a result, 16 of the 26 penguins had positive results at Sampling A (61.5%) and 6 of the 23 penguins had positive results at Sampling B (26.1%).

5.4.3 Parasite identification and phylogeny

Mitochondrial cytochrome b gene sequences were obtained for 17 samples from 13 penguins. Phylogenetic analysis revealed four phylogenetic groups/lineages, three *Plasmodium* sp. (A, B and C) and one *Haemoproteus* sp. (D) (Figure 5.1). Two penguins had two samples that yielded two different sequences each (band numbers 508 and 511); one of these (511B) had eight nucleotide polymorphisms (mixed peaks on the sequencing chromatogram) and was excluded from phylogenetic analyses. Two samples were PCR-positive but failed to produce adequate sequencing results (504 and 588). Table 5.2 summarizes evolutionary distance within these groups and published lineages.

Phylogenetic group A comprised sequences obtained from 13 samples (clade bootstrap value = 94%; average evolutionary divergence within group = 0.007 base substitutions per site), and had some of its samples morphologically identified as *P. tejerai* (for detailed descriptions and photomicrographs see SILVEIRA et al., 2013). Lineage B was recovered only from one penguin (516), and its morphospecies could not be determined as only early trophozoites were present in the blood smear; this lineage formed a clade with a known *P. cathemerium* lineage (bootstrap value = 88%; evolutionary divergence = 0.015 base substitutions per site; 98.7% sequence identity). Lineage C was recovered only from one penguin (508) and was morphologically confirmed as *P. elongatum* (Figure 5.2a-i); this lineage formed a strongly supported clade (bootstrap value = 99%; average evolutionary divergence within group = 0.004 base substitutions per site) with a known *P. elongatum* lineage (98.5% sequence identity) and with a *Plasmodium* sp. lineage previously identified in Magellanic penguins (98.0% sequence identity). Lineage D was recovered only from one penguin (586) and

its morphospecies could not be determined because no parasite forms were present in the blood smear; this lineage formed a clade (bootstrap value = 81%; average evolutionary divergence within group = 0.009 base substitutions per site) with *H. (Parahaemoproteus)* sp. lineages obtained from earless owls (*Strix* spp.) in the Northern Hemisphere, including a known *Haemoproteus syrnii* lineage (96.8% sequence identity). The positive control used for the nested PCR reactions was identical to a known *P. gallinaceum* lineage (100% sequence identity) and unrelated to the study lineages.

Mixed infections were identified in three individuals (band numbers 508, 517 and 588), and involved *P. elongatum* and either *P. tejeraei* or *P. (Haemamoeba)* sp. that were compatible with *P. tejeraei* but could not be undoubtedly confirmed. In two cases (503 and 516) the parasites observed at Sampling B were severely degenerated, presumably as a result of chloroquine treatment, producing atypical forms that at times bore little resemblance to typical hemosporidian forms (Figure 5.2j-l).

Nine of 28 penguins (32.1%) died during the study period. Of these, eight (88.9%) had been positive to hemosporidians, i.e. 8 of 18 penguins that obtained positive results died during the study period (44.4%). All hemosporidian-positive deceased penguins were infected with *P. tejeraei*, one of which was co-infected with *P. elongatum*. Even though 58.3% of the penguins confirmed to be infected only with *P. tejeraei* died (7/12), this was not significantly different to the mortality observed among individuals infected or co-infected with other lineages (16.7%; 1/6) ($P = 0.152$).

Parasitemia ranged from 0.001% to 62% (Mean $\pm$ S.D. = 8.66% $\pm$ 18.83%). Even though parasitemia was apparently higher in penguins that died (12.97% $\pm$ 22.22%) than in those that survived (0.06% $\pm$ 0.10%), this difference did not reach significance ($t = 1.642$, $df = 7$, $P = 0.072$). Trophozoites ($P < 0.001$, $R^2 = 0.787$), macrogametocytes ($P < 0.001$, $R^2 = 0.854$) and microgametocytes ($P = 0.008$, $R^2 = 0.585$) were unevenly distributed among parasite lineages (Table 5.3), but not meronts ($P = 0.390$).

Figure 5.1 - Maximum likelihood phylogenetic tree of the mitochondrial cytochrome b gene of the studied hemosporidian lineages. Lineages identified in this study are emphasized in blue. When available, information on the morphospecies observed on the corresponding blood smear is provided. Branch lengths are drawn proportionally to evolutionary distance (scale bar is shown). Lower bootstrap values (< 50) are omitted

Source: Vanstreels (2014)

Figure 5.2 - Blood parasites in Giemsa-stained blood smears from Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*)

Source: Vanstreels (2014)

Legend: *Plasmodium (Huffia) elongatum* (508B): (a-d) trophozoites, (e,f) meronts, (g,h) macrogametocytes, (i) microgametocyte; (j-l) chloroquine-degenerated *Plasmodium (Haemamoeba)* sp. (503B)

5.4.4 Hematology and pathology

Table 5.3 summarizes the average hematological results for blood smears of penguins infected by different hemosporidian lineages. No significant differences were observed in these hematological parameters between Sampling A and B, whether they were positive to hemosporidians or not (all $P > 0.05$), nor between penguins that died or those that survived (all $P > 0.05$). Parasitemia was positively correlated to lymphocytes ($P = 0.022$, $R^2 = 0.364$), monocytes ($P = 0.043$, $R^2 = 0.285$) and PCV ($P = 0.034$, $R^2 = 0.642$) and was negatively correlated to heterophils ($P = 0.026$, $R^2 = 0.348$); no significant correlation was observed between parasitemia and basophils, eosinophils, EELC or HLR (all $P > 0.05$).

Histopathology was examined for three individuals (506, 584, 593), all of which were infected only with *P. tejerai*. Tissue meronts were occasionally present in macrophages, but were overall most common in endothelial cells. Meronts were most frequent in the heart and kidneys, moderately frequent in the lungs and colon, and were rare in other tissues (spleen, liver, testicles, brain, duodenum, pancreas, gastrointestinal tract-associated lymphoid tissue, thyroid, parathyroid). Penguin 584 was considered to have a higher number of tissue meronts (approx. 2-3 per 10 high magnification microscope fields) than penguins 506 and 593 (less than 1 per 10 fields), whereas ante-mortem parasitemia was considerably higher in 506 (62%) and 593 (30%) than in 584 (7.4%). Tissue meronts ranged between 10 and 80 μm in largest diameter, most frequently from 15 to 30 μm . They were often round or oval, with merozoites distributed near the external surface forming structures resembling arcs (Figure 5.3a) or semi-arcs (Figure 5.3b), or were elongated and contained randomly scattered merozoites (Figure 5.3c). The envelope of tissue meronts was mildly eosinophilic, thin and poorly defined; merozoites were round and densely stained with size of approximately 1 μm in diameter. Each meront contained tens to hundreds of visible merozoites, although generally less than 20 merozoites were visible in 3 μm -thick histological sections.

Major pathological processes included: moderate to severe diffuse interstitial granulocytic pneumonia, moderate to severe pulmonary edema and congestion, severe acute necrotizing splenitis, moderate multifocal to coalescent mixed or predominantly mononuclear necrotizing hepatitis, mild to moderate multifocal interstitial sub-acute nephritis, moderate diffuse iron deposits in the lungs, liver and spleen, mild to moderate spleen histiocytosis, mild to moderate multifocal necrosis of gut-associated lymphoid tissues, mild diffuse granulocytic myocarditis, multifocal to coalescent areas of cardiomyolysis. Penguin 584 also had diffuse acute vasculitis associated to the formation of intravascular cloths. Death probably resulted from cardiorespiratory insufficiency secondary to pneumonia and, in the case of penguin 584, in association with disseminated vasculitis and intravascular coagulation. No signs or lesions suggestive of viral, bacterial or fungal co-infections were observed.

Figure 5.3 - Tissue meronts of *Plasmodium (Haemamoeba) tejeraei* in tissues of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). Hematoxylin-Eosin, penguin 584

Source: Vanstreels (2014)

Legend: (a) liver, (b) parathyroid, (c) heart

Table 5.3 - Hematological results and quantification of blood parasites in blood smears (Mean $\pm$ S.D.)

	<i>P. tejeraei</i> (lineage A)	<i>Plasmodium</i> sp. (lineage B)	<i>P. elongatum</i> + <i>Plasmodium</i> sp.	<i>Haemoproteus</i> sp. (lineage D)	Negative to hemosporidians
Parasite forms					
Trophozoites	80.3% $\pm$ 13.6%	100%	21.7% $\pm$ 17.3%	-	-
Meronts	13.3% $\pm$ 11.6%	0%	5.5% $\pm$ 9.7%	-	-
Macrogametocytes	4.6% $\pm$ 4.2%	0%	33.7% $\pm$ 8.5%	-	-
Microgametocytes	2.1% $\pm$ 1.9%	0%	39.0% $\pm$ 25.0%	-	-
Parasitemia	14.5% $\pm$ 23.5%	< 0.001%	5.6% $\pm$ 6.1%	-	-
Sample size (n)	7	1	3	-	-
Hematology					
Heterophils	48.1% $\pm$ 17.2%	70.5% $\pm$ 12.0%	45.3% $\pm$ 16.9%	53.5% $\pm$ 24.7%	51.1% $\pm$ 14.7%
Eosinophils	1.8% $\pm$ 1.5%	0%	2.0% $\pm$ 1.1%	2.0% $\pm$ 1.4%	2.7% $\pm$ 1.8%
Basophils	0.3% $\pm$ 0.5%	0.5% $\pm$ 0.7%	0.2% $\pm$ 0.4%	0%	0.3% $\pm$ 0.7%
Lymphocytes	49.0% $\pm$ 15.7%	29.5% $\pm$ 12.0%	51.8% $\pm$ 14.9%	44.0% $\pm$ 24.0%	46.0% $\pm$ 13.9%
Monocytes	1.1% $\pm$ 1.8%	0%	1.2% $\pm$ 2.0%	1.5% $\pm$ 0.7%	0.3% $\pm$ 0.6%
HLR	1.24 $\pm$ 0.74	2.66 $\pm$ 1.43	1.10 $\pm$ 0.99	1.61 $\pm$ 1.43	1.35 $\pm$ 1.19
EELC	13.6% $\pm$ 9.5%	25% $\pm$ 7.0%	14.3% $\pm$ 12.8%	7.5% $\pm$ 3.5%	9.2% $\pm$ 4.8%
PCV	38.2% $\pm$ 3.6%	22.0% $\pm$ 2.8%	30.8% $\pm$ 7.8%	39.5% $\pm$ 0.7%	36.9% $\pm$ 6.1%
Sample size (n)	17	2	6	2	16

5.5 DISCUSSION

Penguins are notoriously susceptible to avian malaria, and Magellanic penguins are not an exception (JONES; SHELLAM, 1999a). Fix et al. (1988) reported three successive malaria outbreaks leading to the mortality of 15.2%, 51.3% and 57.9% of Magellanic penguins captive at a zoo in Iowa, USA (cumulative mortality = 82.6%; n = 46). Bueno et al. (2010) reported an outbreak with 80% infection rate and 60% mortality of Magellanic penguins captive at a zoo in São Paulo, Brazil (n = 5). In this study, we observed 60.7% infection rate and 32.1% mortality of Magellanic penguins undergoing rehabilitation during summer in Florianópolis, Brazil (n = 28).

The use of chloroquine and primaquine for the treatment of avian malaria in penguins was first proposed by Stoskopf and Beier (1979), and is based on the combined antiprotozoal effect of chloroquine on the circulating stages and of primaquine on the tissue stages (REMPLE, 2004). Because we were unable to administer primaquine the poor performance of the drug treatment in this outbreak was not entirely unexpected. However, Fix et al. (1988) and Bueno et al. (2010) did administer the combined drug treatment and still were confronted with high mortality rates, suggesting a poor efficacy of these drugs, as has also been reported for other penguin species (SLADEN et al., 1979; CRANFIELD et al., 1994). Our observation of degenerated erythrocytic parasites in blood smears of some of the penguins subjected to five days of chloroquine treatment suggests an effective antiprotozoal action of this drug on circulating parasites. Unfortunately, because histopathology was conducted only for individuals that died before drug treatment was initiated, we could not evaluate its effects on the parasites' tissue stages, if any.

Four lineages of hemosporidians were involved in the outbreak: *Plasmodium* (*Haemamoeba*) *tejerai*, an unidentified *Plasmodium* (*Haemamoeba*) sp. ("lineage B"), *Plasmodium* (*Huffia*) *elongatum*, and an unidentified *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) sp. Furthermore, because four lineages could not be conclusively identified, it is possible that additional hemosporidian lineages/species were present.

The finding of *P. tejeraei* in Magellanic penguins corresponds to the first cases of this parasite other than its original description in domestic turkeys (*Meleagris gallopavo*) in Venezuela (GABALDÓN; ULLOA, 1977). *P. tejeraei* played a predominant role in the studied outbreak, being identified in 72.2% of the hemosporidian-infected penguins. Furthermore, the observation that 61.6% of the penguins diagnosed with *P. tejeraei* have died suggests this is a highly pathogenic parasite for penguins.

Necropsy and histopathology indicated the death of *P. tejeraei*-infected penguins was associated with a significant impairment of cardiorespiratory function and, at least in one case, disseminated vasculitis and intravascular clotting. These findings are not unlike those observed in other malaria outbreaks in penguins (HUFF; SHIROISHI, 1962; GRÜNBERG; KUTZER, 1963; FLEISCHMAN et al., 1968b; HERMAN et al., 1968; BAK et al., 1984; FIX et al., 1988), and are compatible with the mechanisms of avian malaria pathogenesis described in other birds (ATKINSON; VAN RIPER III, 1991; VALKIŪNAS, 2005; WILLIAMS, 2005). The semi-arc or arc-shaped tissue meronts observed in these infections seem unusual and distinct from those classically reported in avian hemosporidians (HUFF, 1942; GARDINER et al., 1998; VALKIŪNAS, 2005), and could be a characteristic morphological feature of *P. tejeraei*, meriting further investigation. It should be noted that such tissue meront morphology is paralleled by the parasite's morphology in erythrocytes: rosette-shaped erythrocytic meronts in which the merozoites are distributed in an arc near the external border of the parasite's cytoplasm are one of the key morphological characteristics for the identification of *P. tejeraei* in blood smears (SILVEIRA et al., 2013).

Plasmodium sp. lineage B was identified in one penguin and could not be identified on the basis of parasite morphology on blood smears because only early trophozoites were present, however sequencing data suggests it belongs to the subgenus *Haemamoeba* and is closely related to *P. cathemerium*. In a review on the parasitology of zoo animals, Luera-Carbo (1965) mentions that *P. cathemerium* infects king penguins (*Aptenodytes patagonicus*), presumably at the Barcelona Zoo, Spain; however, because no details were provided on the methods and criteria for species identification, this record cannot be confirmed. It should be considered that the identification of *P. cathemerium* in penguins merits particular caution since there is

significant morphological similarity between this parasite and *P. relictum* (VALKIŪNAS, 2005), a species frequently reported in penguins worldwide (FANTHAM; PORTER, 1944; RAETHEL, 1960; GRINER; SHERIDAN, 1967; STOSKOPF; BEIER, 1979; FIX et al., 1988). Furthermore, the morphology of avian hemosporidians is known to vary considerably when transmitted to different hosts, contributing to confusion in their identification (LAIRD; VAN RIPER, 1981; VALKIŪNAS, 2005). Because we were not able to confirm the species identity through morphological analysis, we consider that additional evidence is necessary before it may be conclusively demonstrated that *P. cathemerium* infects penguins.

P. elongatum is a cosmopolitan parasite that may infect a broad variety of avian hosts, particularly Passeriformes (VALKIŪNAS, 2005), and is not uncommon in penguins captive in North America (FLEISCHMAN et al., 1968a; SLADEN et al., 1979; STOSKOPF; BEIER, 1979; GRACZYK et al., 1994). Similarly to the reports from North American zoos, *P. elongatum* played a secondary role and did not produce high mortality during malaria outbreaks in penguins. All three cases of *P. elongatum* infection herein examined had a second *Plasmodium* (*Haemamoeba*) sp. lineage, whether confirmed as *P. tejeraei* or not; this is also not unusual as co-infection by *P. elongatum* and *P. (Haemamoeba)* sp. has been frequently reported in captive penguins in North America (HUFF; SHIROISHI, 1962; STOSKOPF; BEIER, 1979; CRANFIELD et al., 1994; GRACZYK et al., 1994).

Bueno et al. (2010) identified two lineages of *Plasmodium* sp. in Magellanic penguins at São Paulo Zoo, and used BLAST to determine high sequence identity with two lineages that had been registered on GenBank as *P. relictum*, AY733088 and AY733089. However, Valkiūnas et al. (2008a) indicated that AY733088 had been misidentified and probably corresponds to *P. elongatum* instead. Our results support this interpretation, and suggest that the two lineages identified by Bueno et al. (2010) correspond to two distinct species, of which one (HM031937) corresponds to *P. elongatum* and the other (HM031936) corresponds to a *Plasmodium* (*Haemamoeba*) sp. lineage closely related to *P. lutzi*. This corroborates the warnings that sequence identity in GenBank/BLAST databases search is not an adequate method to conclusively identify avian hemosporidians without complementary morphological analysis

(VALKIŪNAS et al., 2008a,b; BENSCH et al., 2009). On the other hand, our results indicate there is no direct relationship between the *Plasmodium* sp. lineages herein detected and those found in Galapagos penguins, which remain unidentified.

Sequencing results indicate that a *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) sp. lineage was present in one penguin. *Haemoproteus* sp. is a common avian hemosporidian that is seldom considered pathogenic (ATKINSON; VAN RIPER III, 1991; VALKIŪNAS, 2005). Only twice have these parasites been recorded in penguins: DNA from this parasite has been detected in live Galapagos penguins at Galapagos Archipelago (LEVIN et al., 2009) and in deceased little penguins (*Eudyptula minor*) in Western Australia (CANNEL et al., 2013). All *Haemoproteus* spp. infections in penguins were identified through gene sequencing analysis, as no circulating stages or only early trophozoites were detected in blood smears. Similarly, we failed to detect circulating parasites in the blood smears corresponding to the PCR-positive sample sequenced as *Haemoproteus* sp. This may indicate a very low parasitemia, insufficient to allow for blood smear detection (GARAMSZEGLI, 2010), or could correspond to the detection of DNA from recently inoculated sporozoites which may or not succeed to produce infection (VALKIŪNAS et al., 2009; LEVIN et al., 2013). Phylogenetic analysis indicated the *Haemoproteus* sp. lineage identified in this study was not closely related to those previously identified in penguins, and instead was neatly clustered with those found in earless owls (*Strix* spp.) in Europe and North America, including a *Haemoproteus syrnii* lineage. Three *Strix* spp. are native to the Florianópolis region (*S. huhula*, *S. hylophila*, and *S. virgata*) (CBRO, 2011; IUCN, 2014) and could have served as reservoirs of infection.

Parasitemia was positively correlated to lymphocyte and monocyte counts and inversely correlated to heterophil counts, corroborating the observation that avian malaria elicits a predominantly mononuclear leukocytosis in penguins (GRACZYK et al., 1994). On the other hand, parasitemia was positively correlated to PCV, which contradicts classical findings that *Plasmodium*-induced hemolysis results in decreased PCV (ATKINSON; VAN RIPER III, 1991; GRACZYK et al., 1994; WILLIAMS, 2005); this could be explained by a false elevation of PCV due to dehydration as a result from anorexia and febrile syndrome.

Avian-infecting *Plasmodium* spp. are exclusively transmitted by mosquitoes (Culicidae), and gene sequencing data indicates all *Haemoproteus* spp. identified to date in penguins belong to the subgenus *Parahaemoproteus* (LEVIN et al., 2009; CANNEL et al., 2013), which is transmitted by biting midges (Ceratopogonidae) (VALKIŪNAS, 2005). Both mosquitoes and biting midges are abundant in the studied rehabilitation center during summer (subj. obs.). This, combined to the observation that all deaths in the studied malaria outbreak occurred within a 16-days period during summer whereas most penguins had been in the same facility for several months, corroborates the interpretation that infection occurred during rehabilitation, as opposed to a recrudescence/exacerbation of infections acquired in the wild. An alternative, less likely in our opinion, is that one or more penguins relapsed from an asymptomatic *Plasmodium* infection and transmitted the parasite to the other penguins. Although transmission from mosquitoes infected while feeding on local native birds to penguins is likely responsible for the initiation of these outbreaks, the fact that some penguins had large numbers of gametocytes suggests that penguin-mosquito-penguin transmission could play a role in later stages of the outbreak. Early diagnosis, quarantine and treatment of affected individuals could therefore be beneficial to the mitigation of outbreaks in penguins undergoing rehabilitation. Because these parasites may be transmitted through the inoculation of blood from an infected bird to another (VALKIŪNAS, 2005), penguin rehabilitators should also take care to prevent iatrogenic transmission.

Our findings corroborate the strong seasonality of avian malaria outbreaks in captive penguins, which are consistently concentrated in the late summer and early autumn across the world (RODHAIN, 1939; GRINER; SHERIDAN, 1967; BAK et al., 1984; FIX et al., 1988; GRACZYK et al., 1994; KO et al., 2008; BUENO et al., 2010). Rehabilitation centers would thus benefit from narrowing their malaria prevention efforts to the minority of Magellanic penguins that are maintained throughout summer, as opposed to the majority of penguins admitted and released during winter and early spring (GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2006, 2010).

REFERENCES

ATKINSON, C. T.; DUSEK, R. J.; LEASE, J. K. Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 1, p. 20-27, 2001

ATKINSON, C. T.; LAPOINTE, D. A. Introduced avian diseases, climate change, and the future of Hawaiian honeycreepers. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, n. 1, p. 53-63, 2009.

ATKINSON, C. T.; VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: LOYE, J. E.; ZUK, M. **Bird-parasite interactions: ecology, evolution and behaviour**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 19-48.

BAK, Ung-Bok; PARK, Jae-Chan; LIM, Young-Jae. An outbreak of malaria in penguins at the Farm-land Zoo. **Korean Journal of Parasitology**, v. 22, n. 2, p. 267-272, 1984.

BEADELL, J. S.; ISHTIAQ, F.; COVAS, R.; MELO, M.; WARREN, B. H.; ATKINSON, A. T.; BENSCH, S.; GRAVES, G. R.; JHALA, Y. V.; PEIRCE, M. A.; RAHMANI, A. R.; FONSECA, D. M.; FLEISCHER, R. C. Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. **Proceedings of the Royal Society Society B**, v. 273, p. 2935-2944, 2006.

BENSCH, S.; HELLGREN, O.; PÉREZ-TRIS, J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. **Molecular Ecology Research**, v. 9, p. 1353-1358, 2009.

BUENO, M. G.; LOPEZ, R. P. G.; MENEZES, R. M. T.; COSTA-NASCIMENTO, M. J.; LIMA, G. F. M. C.; ARAÚJO, R. A. S.; GUIDA, F. J. V.; KIRCHGATTER, K. Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo Zoo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1-2, p. 123-127, 2010.

CANNELL, B. L.; KRASNEC, K. V.; CAMPBELL, K.; JONES, H. I.; MILLER, R. D.; STEPHENS, N. The pathology and pathogenicity of a novel *Haemoproteus* spp. infection in wild Little Penguins (*Eudyptula minor*). **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 1-2, p. 74-84, 2013.

CHAGAS, C. R. F.; VALKIŪNAS, G.; NERY, C. V. C.; HENRIQUE, P. C.; GONZALEZ, I. H. L.; MONTEIRO, E. F.; GUIMARÃES, L. O.; ROMANO, C. M.; KIRCHGATTER, K. *Plasmodium (Novyella) nucleophilum* from an Egyptian Goose in São Paulo Zoo, Brazil: microscopic confirmation and molecular characterization. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 2, p. 286-291, 2013.

CBRO. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Lista de aves do Brasil, 10a. edição**. 2011. Disponível em: <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 12 dez. 2011.

CRANFIELD, M. R.; GRACZYK, T. K.; BEALL, F. B.; IALEGGIO, D. M.; SHAW, M. L.; SKJOLDAGER, M. L. Subclinical avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) and induction of parasite recrudescence. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, n. 3, p. 372-376, 1994.

FANTHAM, H. B.; PORTER, A. On a *Plasmodium* (*Plasmodium relictum* var. *spheniscidae*, n. var.), observed in four species of penguins. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 114, p. 279-292, 1944.

FIX, A. S.; WATERHOUSE, C.; GREINER, E. C.; STOSKOPF, M. K. *Plasmodium relictum* as a cause of avian malaria in wild-caught Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 4, p. 610-619, 1988.

FLEISCHMAN, R. W.; SQUIRE, R. A.; SLADEN, W. J. L.; MELBY Jr., E. C. Malaria (*Plasmodium elongatum*) in captive African penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 153, n. 7, p. 928-935, 1968.

GABALDÓN, A.; ULLOA, G. *Plasmodium (Haemamoeba) tejerae* sp. n. en pavo domestico (*Melleagris gallopavo*) del Venezuela. **Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental**, v. 17, p. 255-273, 1977.

GARAMSZEGLI, L. Z. The sensitivity of microscopy and PCR-based detection methods affecting estimates of prevalence of blood parasites in birds. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1197-1203, 2010.

GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D.; RUOPPOLO, V.; REYES, L.; REBSTOCK, G. A.; GRIOT, K.; HEREDIA, S. R.; ADORNES, A. C.; SILVA-FILHO, R. P. Chronic oil pollution harms Magellanic penguins in the Southwest Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 193-198, 2006.

GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D.; RUOPPOLO, V.; SILVA-FILHO, R. P.; ADORNES, A. C.; SENA, D. C.; VELOZO, R.; KOLESNIKOVAS, C. M.; DUTRA, G.; MARACINI, P.; NASCIMENTO, C. C.; RAMOS-JÚNIOR, V.; BARBOSA, L.; SERRA, S. Magellanic penguin mortality in 2008 along the SW Atlantic coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 10, p. 1652-1657, 2010.

GARDINER, C. H.; FAYER, R.; DUBEY, J. P. **An atlas of protozoan parasites in animal tissues (Apicomplexa)**. Washington D.C.: Registry of Veterinary Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 1998. 84 p.

GERING, E.; ATKINSON, C. T. A rapid method for counting nucleated erythrocytes on stained blood smears by digital image analysis. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 879-881, 2004.

GODFREY, R. D.; FEDYNICH, A. M.; PENCE, D. B. Quantification of hematozoa in blood smears. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 23, p. 558-565, 1987.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; McCUTCHAN, T. F.; BICKNESE, E. J. Characteristics of naturally acquired avian malaria infections in naive juvenile African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Parasitological Research**, v. 80, p. 634-637, 1994b.

GRIM, K. C.; van der MERWE, E.; SULLIVAN, M.; PARSONS, N.; McCUTCHAN, T. F.; CRANFIELD, M. *Plasmodium juxtannucleare* associated with mortality in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 34, n. 3, p. 250-255, 2003.

GRINER, L. A.; SHERIDAN, B. W. Malaria (*Plasmodium relictum*) in penguins at the San Diego Zoo. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 1, p. 7-17, 1967.

GRÜNBERG, W.; KUTZER, E. Infektionen mit *Plasmodium praecox* bei Humboldt- (*Spheniscus humboldti*) und Brillenpinguinen (*Spheniscus magellanicus*). **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene**, v. 189, p. 511-520.

HAWKEY, C.; SAMOUR, H. J.; HENDERSON, G. M.; HART, M. G. Haematological findings in captive gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) with bumblefoot. **Avian Pathology**, v. 14, p. 251-256, 1985.

HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 797-802, 2004.

HERMAN, C. M.; KOCAN, R. M.; SNYDER, E. L.; KNISLEY, J. O. *Plasmodium elongatum* from a penguin. **Bulletin of the Wildlife Disease Association**, v. 4, p. 132, 1968.

HUFF, C. G. Schizogony and gametocyte development in *Leucocytozoon simondi*, and comparisons with *Plasmodium* and *Haemoproteus*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 71, n. 1, p. 18-32, 1942.

HUFF, G. C.; SHIROISHI, T. S. Natural infection of Humboldt's penguin with *Plasmodium elongatum*. **Journal of Parasitology**, v. 48, n. 3, p. 495, 1962.

IUCN. INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **IUCN Red List of Threatened Species Version 2013.2**. 2014. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

ISHAK, H. D.; DUMBACHER, J. P.; ANDERSON, N. L.; KEANE, J. J.; VALKIŪNAS, G.; HAIG, S. M.; TELL, L. A.; SEHGAL, R. N. M. Blood parasites in owls with conservation implications for the Spotted Owl (*Strix occidentalis*). **PLOS One**, v. 3, n. 5, e2304, 2008.

JONES, H. I.; SHELLAM, G. R. The occurrence of blood-inhabiting protozoa in captive and free-living penguins. **Polar Biology**, v. 21, p. 5-10, 1999a.

JONES, H. I.; SHELLAM, G. R. Blood parasites in penguins, and their potential impact on conservation. **Marine Ornithology**, v. 27, p. 181-184, 1999b.

JOVANI, R.; TELLA, J. L.; FORERO, M. G.; BERTELOTTI, M.; BLANCO, G.; CEBALLOS, O.; DONÁZAR, J. A. Apparent absence of blood parasites in the Patagonian seabird community: is it related to the marine environment? **Waterbirds**, v. 24, n. 3, p. 430-433, 2001.

KARADJIAN, G.; PUECH, M. P.; DUVAL, L.; CHAVATTE, J. M.; SNOUNOU, G.; LANDAU, I. *Haemoproteus syrnii* in *Strix aluco* from France: morphology, stages of sporogony in a hippoboscid fly, molecular characterization and discussion on the identification of *Haemoproteus* species. **Parasite**, v. 20, p. 32, 2013.

KARESH, W. B.; UHART, M. M.; FRERE, E.; GANDINI, P.; BRASELTON, E.; PUCHE, H.; COOK, R. A. Health evaluation of free-ranging Rockhopper Penguins (*Eudyptes chrysocomes*) in Argentina. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 30, n. 1, p. 25-31, 1999.

KEYMER, I. F.; MALCOLM, H. M.; HUNT, A.; HORSLEY, D. T. Health evaluation of penguins (Sphenisciformes) following mortality in the Falklands (South Atlantic). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 45, p. 159-169, 2001.

KO, Kyeong-Nam; KANG, Sang-Chul; JUNG, Ji-Youl; BAE, Jong-Hee; KIM, Jae-Hoon. Avian malaria associated with *Plasmodium* spp. infection in a penguin in Jeju Island. **Korean Journal of Veterinary Research**, vol. 48, n. 2, p. 197-201, 2008.

LAIRD, M.; VAN RIPER, C. Questionable reports of *Plasmodium* from birds in Hawaii, with the recognition of *P. relictum* ssp. *capistranoae* (Russel, 1932) as the avian malaria parasite there. In: CANNING, E. U. **Parasitological topics**: a presentation volume to P.C.C. Garnham, F.R.S. on the occasion of his 80th birthday 1981. Lawrence: Allen Press, 1981. p. 159-165.

LEVIN, I. I.; OUTLAW, D. C.; VARGAS, F. H.; PARKER, P. G. *Plasmodium* blood parasite found in endangered Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). **Biological Conservation**, v. 142, p. 3191-3195, 2009.

LEVIN, I. I.; ZWIERS, P.; DEEM, S. L.; GEEST, E. A.; HIGASHIGUCHI, J. M.; IEZHOVA, T. A.; JIMÉNEZ-UZCÁTEGUI, G.; KIM, D. H.; MORTON, J. P.; PERLUT, N. G.; RENFREW, R. B.; SARI, E. H. R.; VALKIŪNAS, G.; PARKER, P. G. Multiple lineages of avian malaria parasites (*Plasmodium*) in the Galapagos islands and evidence for arrival via migratory birds. **Conservation Biology**, v. 27, n. 6, p. 1366-1377, 2013.

LUERA-CARBO, R. El parasitismo en el zoo. **Revista Veterinaria Venezolana**, v. 18, p. 185-188, 1965.

MILLER, G. D.; HOFKIN, B. V.; SNELL, H.; HAHN, A.; MILLER, R. D. Avian malaria and Marek's disease: potential threats to Galapagos penguins *Spheniscus mendiculus*. **Marine Ornithology**, v. 29, p. 43-46, 2001.

OUTLAW, D. C.; RICKLEFS, R. E. Rerooting the evolutionary tree of malaria parasites. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 108, p. 13183-13187, 2011.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, p. 817-818, 1998.

QUILLFELDT, P.; MARTÍNEZ, J.; HENNICKE, J.; LUDYNIA, K.; GLADBACH, A.; MASELLO, J. F.; RIOU, S.; MERINO, S. Hemosporidian blood parasites in seabirds: a comparative genetic study of species from Antarctic to tropical habitats. **Naturwissenschaften**, v. 97, p. 809-817, 2010.

RAETHEL, H. S. Plasmodieninfektionen bei Pinguinen des Berliner Zoologischen Gartens und ihre Bedeutung für die Pinguinhaltung. **Kleintier-Praxis**, v. 5, p. 64-70, 1960.

RAMOS, A. M.; SANTOS, L. A. R. D.; FORTES, L. T. G. **Normais climatológicas do Brasil 1961-1990**. Brasília: Instituto Nacional de Meteorologia, 2009. 465 p.

REMPLE, J. D. Intracellular Hematozoa of raptors: a review and update. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 18, p. 75-88, 2004.

RIBEIRO, S. F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F. C. S.; MARINI, M. Â.; VAGO, A. R.; BRAGA, É. M. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. **Parasitology**, v. 130, p. 261-267, 2005.

RICKLEFS, R. E.; FALLON, S. M. Diversification and host switching in avian malaria parasites. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 269, p. 885-892, 2002.

RODHAIN, J. L'infection a *Plasmodium relictum* chez les pingouins. **Annales de Parasitologie**, v. 17, n. 2, p. 139-157, 1939.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **BioTechniques**, v. 17, p. 914-921, 1994.

SILVA-FILHO, R. P.; RUOPPOLO, V. Sphenisciformes. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens** – medicina veterinária. São Paulo: Roca, 2007. p. 309-323.

SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; LACORTE, G. A.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; VANSTREELS, R. E. T.; STEINDEL, M.; CATÃO-DIAS, J. L.; VALKIŪNAS, G.; BRAGA, É. M. Parasitological and new molecular-phylogenetic characterization of the malaria parasite *Plasmodium tejerae* in South American penguins. **Parasitology International**, v. 62, p. 165-171, 2013.

SLADEN, W. J. L.; GAILEY-PHIPPS, J. J.; DIVERS, B. J. Medical problems and treatment of penguins at the Baltimore Zoo. **International Zoo Yearbook**, v. 19, p. 202-209, 1979.

SMITH, K. M.; KARESH, W. B.; MAJLUF, P.; PAREDES, R.; ZAVALAGA, C.; REUL, A. H.; STETTER, M.; BRASELTON, W. E.; PUCHE, H.; COOK, R. A. Health evaluation of free-ranging Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Peru. **Avian Diseases**, v. 52, p. 130-135, 2008.

STOSKOPF, M. K.; BEIER, J. Avian malaria in African black-footed penguins. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 175, n. 9, p. 944-947, 1979.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

VALKIŪNAS, G. **Avian malaria parasites and other haemosporidia**. Boca Ratón: CRC Press, 2005. 932 p.

VALKIŪNAS, G.; ATKINSON, C. T.; BENSCH, S.; SEHGAL, R. N. M.; RICKLEFS, R. E. Parasite misidentifications in GenBank: how to minimize their number? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 6, p. 247-248, 2008.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; LOISEAU, C.; SEHGAL, R. N. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics detect sporozoites of hemosporidian parasites in peripheral blood of naturally infected birds. **Journal of Parasitology**, v. 95, p. 1512-1515, 2009.

VALKIŪNAS, G.; ZEHTINDJIEV, P.; DIMITROV, D.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; IEZHOVA, T. A.; BENSCH, S. Polymerase chain reaction-based identification of *Plasmodium (Huffia) elongatum*, with remarks on species identity of haemosporidian lineages deposited in GenBank. **Parasitological Research**, v. 102, p. 1185-1193, 2008.

WALLACE, R. S.; TEARE, J. A.; DIEBOLD, E.; MICHAELS, M.; WILLIS, M. J. Hematology and plasma chemistry values in free-ranging Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Chile. **Zoo Biology**, v. 14, p. 311-316, 1995.

WILLIAMS, R. B. Avian malaria: clinical and chemical pathology of *Plasmodium gallinaceum* in the domesticated fowl *Gallus gallus*. **Avian Pathology**, v. 34, p. 29-47, 2005.

YILDIRIM, A.; AYSUL, N.; BAYRAMLI, G.; INCI, A.; EREN, H.; AYPAK, S.; DUZLU, O.; CILOGLU, A.; ONDER, Z. Detection and molecular characterization of a *Haemoproteus* lineage in a tawny owl (*Strix aluco*) in Turkey. **Veterinary Journal of the Ankara University**, v. 69, p. 179-183, 2013.

Appendix A - GenBank ascension numbers of the sequences analyzed. Taxonomic names within brackets indicate the taxon to which the species is presumed to correspond on the basis of phylogenetic analyses

Sample / Reference	Morphospecies	GenBank
503B	<i>Plasmodium</i> (<i>Haemamoeba</i>) sp. [<i>Plasmodium tejeraï</i>]	KJ575551
506A	<i>Plasmodium tejeraï</i>	JX272844
507A	<i>Plasmodium tejeraï</i>	KJ575544
508A	<i>Plasmodium elongatum</i>	HQ591360
508B	<i>Plasmodium tejeraï</i>	KJ575552
511A	[<i>Plasmodium tejeraï</i>]	KJ575545
512A	[<i>Plasmodium tejeraï</i>]	KJ575546
516B	<i>Plasmodium</i> sp. [<i>Plasmodium</i> (<i>Haemamoeba</i>) sp.]	KJ575553
518A	[<i>Plasmodium tejeraï</i>]	KJ575547
520A	<i>Plasmodium tejeraï</i>	HQ591361
586B	[<i>Haemoproteus</i> (<i>Parahaemoproteus</i>) sp.]	KJ575554
589A	[<i>Plasmodium tejeraï</i>]	KJ575548
590A	<i>Plasmodium tejeraï</i>	KJ575549
16437A	[<i>Plasmodium tejeraï</i>]	KJ575550
Bueno et al. 2010	<i>Plasmodium</i> sp. [<i>Plasmodium elongatum</i>]	HM031936
Bueno et al. 2010	<i>Plasmodium</i> sp. [<i>Plasmodium</i> (<i>Haemamoeba</i>) sp.]	HM031937
Levin et al. 2013	[<i>Plasmodium</i> sp.]	JF833046
Levin et al. 2013	[<i>Plasmodium</i> sp.]	JF833047
Cannell et al. 2013	[<i>Haemoproteus</i> (<i>Parahaemoproteus</i>) sp.]	KC121053
Cannell et al. 2013	[<i>Haemoproteus</i> (<i>Parahaemoproteus</i>) sp.]	KC121054
Cannell et al. 2013	[<i>Haemoproteus</i> (<i>Parahaemoproteus</i>) sp.]	KC121055
Cannell et al. 2013	[<i>Haemoproteus</i> (<i>Parahaemoproteus</i>) sp.]	KC121056
Levin et al. 2009	[<i>Haemoproteus</i> (<i>Parahaemoproteus</i>) sp.]	GQ395686
Ishak et al. 2008	[<i>Haemoproteus</i> (<i>Parahaemoproteus</i>) sp.]	EU627834
Ricklefs; Fallon 2002	[<i>Haemoproteus</i> (<i>Parahaemoproteus</i>) sp.]	AF465589
Yildirim et al. 2013	[<i>Haemoproteus</i> (<i>Parahaemoproteus</i>) sp.]	JQ768232
Chagas et al. 2013	<i>Plasmodium nucleophilum</i>	JX467689
Karadjian et al. 2013	<i>Haemoproteus syrnii</i>	KF279523

Appendix B - GenBank and MalAvi ascension numbers of the reference lineages sequences analyzed

MalAvi	Morphospecies	GenBank
GRW02	<i>Plasmodium ashfordi</i>	AF254962
SEIAUR01	<i>Plasmodium cathemerium</i>	DQ838988
TURDUS1	<i>Plasmodium circumflexum</i>	AF495576
GRW06	<i>Plasmodium elongatum</i>	DQ368381
GALLUS01	<i>Plasmodium gallinaceum</i>	AY099029
ANLAT01	<i>Plasmodium globularis</i>	EU770151
SW2	<i>Plasmodium homonucleophilum</i>	AF495572
GALLUS03	<i>Plasmodium juxtannucleare</i>	EF011196
CYAOLI09	<i>Plasmodium lucens</i>	FJ404707
TFUS05	<i>Plasmodium lutzi</i>	KC138226
PYSUN1	<i>Plasmodium megaglobularis</i>	DQ847268
ANLAT07	<i>Plasmodium multivacuolaris</i>	FJ404720
ALEDIA02	<i>Plasmodium parahexamerium</i>	EU810634
GRW04	<i>Plasmodium relictum</i>	AF254975
LZFUS01	<i>Plasmodium relictum</i>	AB308046
SGS1	<i>Plasmodium relictum</i>	AF495571
UNKNOWN02	<i>Plasmodium rouxi</i>	AY178904
TFUS06	<i>Plasmodium unalis</i>	KC771248
SYAT05	<i>Plasmodium vaughani</i>	DQ847271
ALCLEU01	<i>Haemoproteus enucleator</i>	DQ659592
CWT4	<i>Haemoproteus majoris</i>	AY393805
TURDUS2	<i>Haemoproteus minutus</i>	DQ060772
PADOM05	<i>Haemoproteus passeris</i>	HM146898
PI PUB01	<i>Haemoproteus picae</i>	EU254552
MODO1	<i>Haemoproteus sacharovi</i>	JX073258
STSEL1	<i>Haemoproteus syrnii</i>	DQ451424
STSEN1	<i>Haemoproteus turtur</i>	DQ451425
ANLAT02	<i>Haemoproteus vacuolatus</i>	EU770153
HAECOL1	<i>Haemoproteus columbae</i>	AF495554
CREFUR01	<i>Haemoproteus jenniae</i>	JN827318
FREMIN01	<i>Haemoproteus iwa</i>	JF833050
COLTAL01	<i>Haemoproteus multipigmentatus</i>	GU296214
GALLUS06	<i>Leucocytozoon schoutedeni</i>	DQ676823

6 EPIDEMIOLOGY AND PATHOLOGY OF AVIAN MALARIA IN PENGUINS UNDERGOING REHABILITATION ALONG THE COAST OF BRAZIL

6.1 ABSTRACT

Rehabilitation of seabirds is a valuable strategy to mitigate the impacts of oil pollution and other anthropogenic impacts, and can significantly contribute to the conservation of penguins. However, infectious diseases such as avian malaria (*Plasmodium* spp.) can hamper the success of these rehabilitation efforts. We combined morphological and molecular diagnostic methods to investigate the epidemiology and pathology of *Plasmodium* in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) at several rehabilitation centers along the coast of Brazil. Malarial parasites were relatively frequent in penguins undergoing rehabilitation (true prevalence was estimated between 6.6% and 13.5%), and 10 distinct phylogenetic clusters of *Plasmodium* were identified. Rehabilitation centers would benefit from narrowing their prevention efforts to penguins maintained or received during austral spring-summer, particularly through the protection of penguins from contact with mosquitoes.

6.2 INTRODUCTION

Avian malaria is a disease caused by mosquito-transmitted protozoans of the genus *Plasmodium*, and more than 60 species infect birds (MARTINSEN; PERKINS, 2013). *Plasmodium* infections tend to be asymptomatic or pose only minor impact on fitness and survival of most birds, however there are cases in which severe disease may develop (LEVIN; PARKER, 2011). In particular, avian malaria is one of the most relevant infectious diseases for captive Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*), a

species native to Argentina, Chile and Malvinas-Falkland Islands (WILLIAMS; BOERSMA, 1995).

There are reports of *Plasmodium* sp infections in Magellanic penguins (MPs) at zoos in the United States (FIX et al., 1988), South Korea (KO et al., 2008) and São Paulo state, Brazil (BUENO et al., 2010), as well as at a rehabilitation center at Santa Catarina state, Brazil (SILVEIRA et al., 2013; VANSTREELS et al., in press)¹⁴. In contrast, none of the studies examining blood or tissue samples of wild MPs have found evidence of *Plasmodium* sp or other blood parasites, and neither have studies on sympatric populations of other penguin species (JONES; SHELLAM, 1999a; QUILLFELDT et al., 2011).

The occurrence of *Plasmodium* sp in MPs in captivity and undergoing rehabilitation but not in the wild suggests that MPs are *Plasmodium*-free when admitted to rehabilitation centers, acquiring the infection during their permanence in these facilities. We examine this hypothesis by conducting a broad survey for *Plasmodium* sp in MPs at rehabilitation centers along the coast of Brazil, determining spatial and temporal distribution of malarial infections, mortality and lineages.

6.3 METHODS

6.3.1 Study locations and data collection

We studied MPs received for rehabilitation at five organizations along the coast of Brazil (Figure 6.1): CRAM-FURG (32°01'34"S 52°06'21"W), CETAS Florianópolis (27°35'51"S 48°26'20"W), FUNDAMAR (23°49'21"S 45°24'53"W), CETAS Unimonte (23°56'50"S 46°23'39"W), and IPRAM (20°19'54"S 40°21'38"W). Each organization receives penguins rescued along the coastline of their state and neighboring states;

¹⁴ VANSTREELS, R. E. T.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; SANDRI, S.; SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; FERREIRA-JUNIOR, F. C.; EPIPHANIO, S.; STEINDEL, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in Magellanic penguins undergoing rehabilitation in Southern Brazil. **PLOS One**, in press.

additionally, CRAM-FURG also receives penguins that were rehabilitated at other states and, as a result, each penguin was assigned a “location” (Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) based on the facility in which they were subjected to rehabilitation (and not rescue location).

Samples were collected in different time periods at each location (Table 6.1). In most cases sampling was considered opportunistic in that it could have over-represented MPs that presented clinical signs and/or necropsy findings that might have been considered suggestive of disease and/or did not span over a sufficiently large time period to encompass different seasons. Only at Rio Grande do Sul between January 2009 and December 2012 and at Santa Catarina between March 2009 and February 2013 sampling was considered systematic, i.e. MPs were evenly sampled without bias towards clinically ill or healthy individuals and over an extended time period. Samples and biological information collected within 0-3 days from admission to the facility were considered “admission”, whereas those collected 0-7 days prior to death or release were considered “exit”. Each individual was classified in relation to their “age group” on admission (juvenile, adult), “oiling” on admission (oiled, not oiled), “survival” through rehabilitation (survivor, deceased) and “diagnosis” (positive, negative). Rehabilitation records were used to determine “warm season period”, i.e. the number of days from admission to death or release that fell between 01 October to 31 March.

Figure 6.1 - Geographic distribution of the sampling effort, detection and lineages of *Plasmodium* spp. in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) undergoing rehabilitation along the coast of Brazil. Pie charts represent sampling effort (size) and percentage of positive results (red fraction). Blue areas represent the breeding (light blue) and historical foraging (darker blue) distribution of Magellanic penguins

Source: Vanstreels (2014)

6.3.2 Study design

Screening for *Plasmodium* combined one or more of the following diagnostic methods: thin blood smears (TBS), nested polymerase chain reaction (PCR) or histopathology (HP). The first step followed the criteria: (a) all TBS collected at all study sites were examined; (b) for 'survivor' penguins, the 'exit' blood sample was tested with PCR; (c) for 'deceased' penguins deceased during rehabilitation, frozen tissue samples collected at necropsy were tested with PCR or, when such samples were not available,

the last blood sample collected before death was tested with PCR. At this step, blood smear examination was blind to PCR results and vice-versa. The second step of *Plasmodium* screening used the criteria: (a) if a penguin obtained a positive or inconclusive result for one or more samples in the first step, all samples available from that individual were tested with PCR; (b) if a penguin obtained a positive result, all samples from other individuals that had been at the same facility at the same date or three weeks prior or following to the date of collection of the positive sample were tested with PCR. Because distinct sets of samples were available for each individual, different combinations of diagnostic tests were used to detect *Plasmodium* across study sites (Table 6.1). Finally, individuals with positive results in the previous steps were subjected to the third step: (a) positive samples were subjected to sequencing of the *cyt-b* gene; (b) histopathology of all available tissue samples of select tissues were evaluated to determine microscopic lesions and determine the occurrence of exoerythrocytic meronts; (c) all available blood smears were used to characterize parasite morphology.

Table 6.1 - Sample sizes examined using different diagnostic tests to screen for *Plasmodium* sp infections. Values within brackets indicate the number of positive samples. “†” indicates that sample collection was systematic, i.e. was not conducted in a manner that would favor sick or healthy individuals. “‡” indicates the collection of samples from penguins were rehabilitated at other facilities then transferred to Rio Grande do Sul but samples were collected upon arrival from transference

Latitude	Study site (time period)	TBS+PCR	PCR	TBS	HP	Total
13°00'S	Bahia (1999-2008) ‡	1 [1]	-	7 [1]	-	8 [2]
13°00'S	Bahia (Jun2009-Dec2012) ‡	21 [2]	-	-	-	21 [2]
20°20'S	Espírito Santo (1999-2008) ‡	-	-	19 [1]	-	19 [1]
20°20'S	Espírito Santo (Sep2012)	86	-	111	-	197
20°20'S	Espírito Santo (Sep2012-Feb2013)	18 [2]	20 [1]	-	-	38 [3]
22°50'S	Rio de Janeiro (1999-2008) ‡	-	-	11	2 [2]	13 [2]
22°50'S	Rio de Janeiro (Jan2009-Dec2012) ‡	2	-	6	-	8
23°58'S	São Paulo (Aug2010-Sep2010)	1	11	-	-	12
27°36'S	Santa Catarina (Mar2009-Feb2013) †	106 [19]	81 [8]	37 [2]	-	224 [29]
32°02'S	Rio Grande do Sul (1999-2008)	-	-	11	2 [2]	13 [2]
32°02'S	Rio Grande do Sul (Jan2009-Dec2012) †	192 [3]	8	21	-	221 [3]
Total	Systematic sample collection (†)	298 [22]	89 [8]	58 [2]	-	445 [32]
	Opportunistic sample collection	120 [5]	31 [1]	165 [2]	4 [4]	329 [12]
	Grand total	427 [27]	120 [9]	223 [4]	4 [4]	774 [44]

6.3.3 Sample collection, hematology and pathology

MPs are subjected to standardized rehabilitation protocols under the supervision of veterinarians (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2007). At all studied facilities, external and internal enclosures in which rehabilitation is conducted are not entirely protected against mosquitoes and are within 500 meters from large bodies of freshwater and/or fragments of Atlantic forest. Penguins were physically restrained and blood samples were collected from the jugular or metatarsal veins. Body mass was determined with a scale with ± 5 g precision. Thin blood smears and heparin capillaries were prepared immediately after blood collection; the remaining blood was stored in tubes with heparin or without anticoagulants, then frozen. Whenever possible, hematocrit was determined through centrifugation in heparin capillaries at 16000 G for 5 min; total plasma protein was determined with a clinical refractometer.

Blood smears were dried at room temperature, fixed with absolute methanol, stained with Giemsa or Wright-Rosenfeld stain, and examined under 1000x magnification (field of view area = 0.126 mm^2). A minimum 150 fields (~30.000 erythrocytes) were examined during the first step of screening and an additional 250 fields (~50.000 erythrocytes) were examined during the second step. Blood parasites were morphologically characterized (VALKIŪNAS, 2005) and quantified with the assistance of digital image analysis to count 10.000 erythrocytes (GERING; ATKINSON, 2004); parasite forms were differentiated into four categories (trophozoite, meront, microgametocyte, macrogametocyte).

Whenever possible penguins deceased during rehabilitation were examined within 12 to 24 hours after death; when this was not possible, carcasses were frozen for later examination. Gross lesions were photographed and noted, and samples of organs and tissues were fixed in 10% buffered formalin. Formalin-fixed tissues were embedded in paraffin and sections of 3 or 5 μm were obtained, stained with hematoxylin-eosin and examined under light microscopy.

6.3.4 Molecular biology and phylogenetic analysis

Frozen samples of blood (total blood, blood cloth or erythrocytes) or tissues (lung, spleen and liver) were used for molecular analyses. DNA extraction was conducted using the DNEasy Blood and Tissue Kit (#69506, Qiagen) and was verified and quantified through UV spectrophotometry (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific). We used a nested polymerase chain reaction targeting the mitochondrial cytochrome b (*cyt-b*) gene of *Haemoproteus/Plasmodium* (HELLGREN et al., 2004) with 3 ng/ μ L of initial sample DNA, 0.6 μ M of each primer, and GoTaq Green Master Mix 2x (M7122, Promega). Blood samples from chicken experimentally infected with *Plasmodium gallinaceum* or raised in arthropod-free environments were used as positive and negative controls, respectively. Gel electrophoresis was conducted to visualize amplification products, using 2% agarose gel, SYBR Safe (S33102, Invitrogen), and a high-resolution imaging system (Gel Doc EZ System 170-8270, Bio-Rad). PCR amplification products of positive samples were purified with Polyethylene Glycol 8000. Bi-directional sequencing with dye-terminator fluorescent labeling was performed through automated sequencing (ABI Prism 3100, Applied Biosystems), and forward and reversed chromatograms were revised and edited; consensus sequences were deposited in GenBank (ascension numbers KJ575544-54 and KJ77717-37).

Phylogenetic relationships among the hemosporidian lineages identified in this study and related hemosporidian parasites were inferred by using sequences from reference lineages from the MalAvi database (BENSCH et al., 2009), for which species was identified based on studies using morphological evidence, as well as penguin-infecting *Plasmodium* lineages from published studies (Figure 6.3). Sequences were aligned using ClustalW (THOMPSON et al., 1997) as implemented in MEGA 5.2.2 (TAMURA et al., 2011). A maximum likelihood phylogenetic tree for the parasite sequences was produced using MEGA 5.2.2 with the GTR + Gamma model of nucleotide evolution, as recommended by ModelTest (POSADA; CRANDALL, 1998), with 1000 bootstrap replications.

6.3.5 Statistical analysis

The Chi-Square test was used to compare diagnosis among laboratory methods (TBS+PCR, PCR, TBS; histopathology was not included due to small sample size). Fisher's exact test was used to determine if the distribution of individuals was heterogeneous in relation to oiling and location (only Rio Grande do Sul and Santa Catarina). Mann-Whitney tests were used to determine if there was association in warm season period or admission mass between categories of location and oiling. Linear regression was used to determine if there was association between warm season period and admission mass. Fisher's exact tests were used to compare diagnosis between categories of location, age group and oiling. Mann-Whitney tests were used to compare warm season period and body mass on admission between categories of diagnosis. Binary logistic regression was employed to determine whether location, warm season period, oiling and admission mass had a significant effect in determining diagnosis. Fisher's exact test was used to compare survival between categories of diagnosis, either overall or within location/age group subsets. All tests were two-tailed and used a significance level of 0.05.

Infection rate was defined as the number of positive individuals divided by the number of tested individuals; apparent prevalence refers to the infection rate in systematically sampled and PCR-tested individuals. True prevalence was estimated using the Blaker's 95% confidence interval (REICZIGEL et al., 2010); this estimate used a 80% sensitivity (JARVI et al., 2002; VALKIŪNAS et al., 2008) and 100% specificity.

6.4 RESULTS

Forty-four MPs were identified as positive to *Plasmodium*, i.e. 5.68% of all penguins tested were positive, with positive individuals being identified at all states except São Paulo (Table 6.1 and Figure 6.1). A substantial fraction of the positive cases

(17/44) were concentrated in a single outbreak that occurred at Santa Catarina in March-April 2009. With the exception of one *Haemoproteus* sp (see VANSTREELS et al., in press)¹⁵, no blood parasites other than *Plasmodium* were detected. No individuals were positive upon admission: in all cases, clinical history and diagnostic results were consistent with infection having occurred during the permanence at rehabilitation facilities. All positive cases were first identified as positive between the months October and April (Figure 6.2).

Individuals tested with PCR and TBS+PCR were more frequently determined to be positive (7.50% and 6.32%, respectively) than those tested with TBS alone (1.79%) ($\chi^2=7.636$, $df=2$, $P=0.022$). For individuals screened with TBS+PCR, all TBS identified as positive were positive in the corresponding PCR test. On the other hand, only 45.5% (10/22) PCR-positive samples were identified as positive in the corresponding TBS.

Figure 6.2 - Monthly distribution of the incidence of *Plasmodium* infections in comparison to the number of penguins undergoing rehabilitation

¹⁵ VANSTREELS, R. E. T.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; SANDRI, S.; SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; FERREIRA-JUNIOR, F. C.; EPIPHANIO, S.; STEINDEL, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in Magellanic penguins undergoing rehabilitation in Southern Brazil. **PLOS One**, in press.

6.4.1 Epidemiology in systematically sampled and PCR-tested individuals

The results in this subsection refers exclusively to individuals that were sampled systematically and tested with PCR (combined with TBS or not), as detailed in Tables 6.1 and 6.2. Additional details on clinical parameters on admission are provided in Appendixes B and C. In this data subset, apparent prevalence was 7.75% (30/387), with estimated true prevalence falling between 6.6% and 13.5%. There was a significant difference in the infection rate in Rio Grande do Sul and Santa Catarina ($P < 0.001$), with respectively 1.5% and 14.4% of penguins being positive. When individuals involved in the malaria outbreak at Santa Catarina in March-April 2009 were excluded from the analysis, this difference was smaller (6.3% vs. 1.5%) but still significant ($P = 0.021$).

Positivity did not differ significantly between age groups ($P = 0.795$), but did in relation to oiling ($P < 0.001$; oiled = 1.4%, not oiled = 19.0%). Warm season period was significantly different between negative (Q_1, Q_2 , and $Q_3 = 0$) and positive penguins ($Q_1=60, Q_2=106, Q_3=135.5$) ($W=64283.5, P < 0.001$). Admission mass was significantly different between positive ($Q_1=2567, Q_2=2806, Q_3=3228$) and negative penguins ($Q_1=2164, Q_2=2458, Q_3=2809$) ($W=58416.5, P = 0.005$). It must be considered, however, that strong association existed between location and oiling ($P < 0.001$), warm season period ($W=33272, P < 0.001$), admission mass ($W=36381.5, P = 0.029$), between oiling and warm season period ($W=34905.5, P < 0.001$) and admission mass ($W=40519.5, P = 0.005$), and between warm season period and admission mass ($P = 0.001, b > 0, R^2 = 0.039$). Logistic regression ($LL = -43.029, P < 0.001$) revealed the following variables were significant determinants of positivity: location ($Z=1.75, P = 0.080$, Santa Catarina OR = 4.21), warm season period ($Z=4.97, P < 0.001, b > 0$), admission mass ($Z=2.47, P = 0.013, b > 0$); oiling did not have a significant effect ($Z=0.59, P = 0.554$).

Survival was significantly different between positive and negative individuals ($P = 0.037$), with 66.6% of the *Plasmodium*-positive penguins dying during rehabilitation whereas 46.21% of the *Plasmodium*-negative penguins were deceased. This difference was significant for adult penguins at Santa Catarina ($P = 0.006$) and was marginally

significant for juvenile penguins at the same location ($P=0.056$), but was not significant for juvenile or adult penguins at Rio Grande do Sul (both $P>0.3$).

Table 6.2 - Details of the diagnostic results in relation to sample collection and testing strategy, age group, oiling and survival

Sampling and screening	Age group	Oiling	Died		Survived		Total
			Positive	Negative	Positive	Negative	
Systematically sampled and PCR-tested individuals	Juvenile	Oiled	3	92	0	81	176
	Adult	Not oiled	13	62	9	67	151
		Oiled	0	5	0	37	42
		Not oiled	4	6	1	7	18
Opportunistically sampled and/or non-PCR-tested individuals	Juvenile	Oiled	1	2	0	9	12
	Adult	Not oiled	7	129	5	213	354
		Oiled	1	5	0	11	17
		Not oiled	0	0	0	4	4
Total			29	301	15	429	774

6.4.2 *Plasmodium* species and lineages

Morphological characterization of parasites in blood smears revealed the occurrence of at least three different morphospecies in sixteen smear-positive individuals (Appendix C): *P. (Novyella) nucleophilum* (Appendix A), *P. (Haemamoeba) tejeraei* and *P. (Huffia) elongatum* (photomicrographs provided respectively in SILVEIRA et al. 2013 and VANSTREELS et al., in press)¹⁶. In three blood smears we observed mature microgametocytes with well-defined elongated rod-shaped pigment granules with pointed ends (Appendix A), which are the defining features of *P. (Haemamoeba) cathemerium* (VALKIŪNAS, 2005), as well as relatively large vacuoles surrounded by small round pigment granules in young macrogametocytes and relatively small meronts

¹⁶ VANSTREELS, R. E. T.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; SANDRI, S.; SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; FERREIRA-JUNIOR, F. C.; EPIPHANIO, S.; STEINDEL, M.; BRAGA, É. M.; CATÃO-DIAS, J. L. Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in Magellanic penguins undergoing rehabilitation in Southern Brazil. **PLOS One**, in press.

with scanty cytoplasm (Appendix A). In four cases parasitemia was insufficient to conclusively identify the morphospecies involved, however in three of these the presence of round gametocytes 1.5 to 2 times larger than the host cell nucleus allowed it to identify the lineage as *P. (Haemamoeba)* sp. Mixed infections were detected in four cases: two cases of *P. elongatum* + *P. (Haemamoeba)* sp, one of *P. nucleophilum* + *P. cathemerium* and one of *P. elongatum* + *P. tejeraei*.

Cyt-b sequences were obtained in 34 of the 36 PCR-positive individuals (Appendix C), and phylogenetic analysis revealed these lineages can be classified in 10 clusters (Figure 6.3). Four clusters could be confirmed as morphospecies based on parasite morphology in blood smears: *P. tejeraei* (cluster A), *P. cathemerium* (cluster B), *P. nucleophilum* (cluster I), and *P. elongatum* (cluster J). Lineages from penguins CRAM2125 (cluster D) and R0093 (cluster E) could not be observed in blood smears, however were neatly clustered with *MalAvi* lineages for which the morphospecies is known. Lineage CRAM2125 had a high bootstrap value (99) and sequence identity (444/445 nucleotides = 99.76%) with *P. (Novyella) unalis*, whereas lineage R0093 had a lower bootstrap value (57) and sequence identity (450/468 = 96.16%) with *P. (Novyella) globularis*. Lineage CRAM1923 had high sequence identity (473/479 = 98.75%) with the *P. cathemerium* reference lineage.

6.4.3 Pathology

Twenty-two *Plasmodium*-positive cases were examined by histopathology, and exoerythrocytic meronts were observed in 86.4% (19/22) cases. Meronts were present in macrophages and endothelial cells (Figure 6.4a), and occurred in a broad variety of tissues, especially in the heart, liver, lungs, spleen and kidneys.

P. tejeraei was lethal to 73% of penguins infected (11/15), and tissue meronts were observed in all six *P. tejeraei* cases examined by histopathology. *P. cathemerium* was identified in 9 MPs, 3 of which died (33% lethality); another two were euthanized for other reasons. Only 1 of 2 *P. nucleophilum*-infected MPs died, and necropsy revealed

there were no tissue meronts but large numbers of intraerythrocytic parasites within blood vessels (Figure 6.4b); the concurrence of other significant pathological processes (severe splenic amyloidosis, helminthes within lungs and liver parenchyma and intestinal blood vessels) did not allow for a conclusion on whether or not avian malaria was the cause of death. *P. elongatum* was identified in one deceased MP, which did present tissue meronts. *Plasmodium* sp lineages E and H were identified in one individual each, and tissue meronts were present in each case. *Plasmodium* lineage D was identified in one deceased penguin, but no tissue meronts were observed and severe respiratory lesions indicated that aspergillosis was the cause of death. *Plasmodium* lineage G was identified in two euthanized individuals; tissue meronts were present in both cases but concurred with other significant lesions (severe aspergillosis accompanied by necrotizing pancarditis; amyloidosis and helminthes within air sacs).

Only one case of mixed infection resulted in death (*P. elongatum* + *P. tejeraï*), however histopathology was not conducted and therefore the role of avian malaria as the cause of death could not be determined.

Interstitial pneumonia was observed in all cases (n = 22), with an inflammatory infiltrate that was predominantly granulocytic (18/22) with moderate (10/22) or moderate-to-severe intensity (5/22) (Figure 6.4c). Hepatitis occurred in all evaluated cases (n = 20), with a predominantly mononuclear inflammatory infiltrate (14/20) (Figure 6.4d) and was most frequently moderate (9/20), moderate-to-severe (5/20) or mild-to-moderate (5/20); hepatic necrosis and ductal hyperplasia was noted in 20% and 25% of cases, respectively (4/20 and 5/20). Splenitis occurred in 75% of cases (15/20), with a predominantly granulocytic (10/15) or mixed inflammatory infiltrate (4/15) and mild-to-moderate (7/15), moderate (3/15) or moderate-to-severe intensity (4/15); necrotizing splenitis and/or lymphocytolysis was observed in 65% of cases (13/20), and massive splenic hemorrhages were observed in two cases (2/20) (Figure 6.4e). Hematopoiesis (60% of cases, 12/20) and hemosiderosis (90%, 18/20) were frequently observed in the spleen and/or liver. Myocarditis was observed in 33.3% of cases (7/21) and was most frequently granulocytic (4/7) and mild (5/7).

Figure 6.3 - Phylogenetic tree of the *Plasmodium* spp. lineages identified in Magellanic penguins undergoing rehabilitation along the coast of Brazil (red), published penguin-infecting lineages (blue) and reference lineages. Branch lengths are drawn proportionally to the amount of changes (scale bar is shown). Bootstrap values lower than 20 are omitted

Source: Vanstreels (2014)

Figure 6.4 - Histological findings associated with avian malaria in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). Hematoxylin-Eosin.
Scale bars = 15 μ m

Source: Vanstreels (2014)

Legend: (a) exoerythrocytic meronts in endothelial cells (arrowheads) within a liver arteriole (R0040, *P. tejerai*); (b) parasitized erythrocyte (arrowhead) within a cerebral blood vessel (CRAM2127, *P. nucleophilum*); (c) diffuse granulocytic interstitial pneumonia, congestion and edema (IF584, *P. tejerai*); (d) diffuse necrotizing splenitis with an exoerythrocytic meront within an endothelial cell of a central arteriole (arrowhead) (R0290, *P. cathemerium*); (e) multifocal perivascular mononuclear hepatitis, congestion and hemosiderosis (R0093, *Plasmodium* sp lineage E).

6.5 DISCUSSION

Avian malaria has been considered one of the most significant infectious diseases for wild and captive penguins (CLARKE; KERRY, 1993; JONES; SHELLAM, 1999b; PARSONS; UNDERHILL, 2005). In this study we demonstrated that *Plasmodium* spp. infect Magellanic penguins at several rehabilitation centers along the Brazilian coast, leading to substantial mortality and limiting the success of rehabilitation efforts for this species.

6.5.1 Epidemiology of avian malaria in penguins at rehabilitation centers

While the overall infection rate ranged from 2.1% to 13.8% among rehabilitation centers, when only samples collected and tested in a systematic manner with highly sensitive diagnostic methods were considered the apparent prevalence was 7.75%, which results in an estimated true prevalence between 6.6% and 13.5%. The only comparable data in the literature is provided by the Southern African Foundation for the Conservation of Coastal Birds (SANCCOB), an organization that rehabilitates African penguins (*Spheniscus demersus*; APs) at South Africa; 17-34% of the APs admitted by SANCCOB in 2001-2002 were positive to *Plasmodium* at some point during their rehabilitation (PARSONS; UNDERHILL, 2005). Furthermore, we found that 4.95% of MPs that survived through rehabilitation were *Plasmodium*-positive at some point, compared to 10.81% of the deceased MPs, with *Plasmodium*-positive penguins facing a 44% higher mortality rate than those *Plasmodium*-negative (66.6% vs. 46.2%). This result contrasts with the epidemiology at SANCCOB, where the release rate of *Plasmodium*-positive individuals is not substantially different from that of the overall population (PARSONS; UNDERHILL, 2005).

There is, however, a critical difference to be considered when comparing our findings with those of SANCCOB: there are no records of *Plasmodium* infections in wild

MPs, whereas APs are infected in the wild (JONES; SHELLAM, 1999a). Therefore whilst we found no evidence to indicate that the MPs we studied carried the infection from the wild, 30-35% of the *Plasmodium*-positive APs are already positive upon admission (PARSONS; UNDERHILL, 2005). In this sense, the epidemiology of avian malaria in Magellanic penguins in rehabilitation centers may resemble more that of captive penguins in the Northern hemisphere than that of their South African counterparts.

In the Northern hemisphere, it is well established that avian malaria in penguins is strongly modulated by seasonality, with cases concentrating in boreal spring-summer due to climate-mediated fluctuations in mosquito abundance (SLADEN et al., 1979; BEIER; STOSKOPF, 1980; FIX et al., 1988). We observed a consistent concentration of all *Plasmodium*-positive cases in austral spring-summer (October to April), with the probability of infection being positively associated with the number of days spent in rehabilitation during that time of the year. In contrast, most MPs are received for rehabilitation along the Brazilian coast during winter months (June to September), particularly those oiled (Figure 6.2). Because rehabilitation protocols attempt to respect the natural migration ecology of the species, the release of individuals during summer is avoided (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2007). As a result, only individuals considered unfit for release until spring will be retained for release in the subsequent winter, besides a small number of individuals received during summer months.

Oiled MPs tend to be in relatively better health condition when compared to those that are not oiled (RODRIGUES et al., 2010), which is probably why they tend to be rapidly rehabilitated and fit for release before summer (Figure 6.2). It is therefore most likely that the higher frequency of *Plasmodium* infection in MPs that were not oiled indirectly reflects the seasonality of the infection, and not a relation to oiling *per se*. The same is probably true to the positive association between *Plasmodium* infection and body mass, as individuals admitted during summer months are often admitted due to moult problems and may have relatively higher body mass (subj. obs.).

The rehabilitation facility at Florianópolis had a substantially higher *Plasmodium* incidence than the remaining, and a few characteristics of this facility may explain this. While all facilities herein studied are to some extent near areas of Atlantic forest and/or freshwater bodies, the facility at Florianópolis is perhaps more so than others. The

facility is located within a State Park (Parque Estadual do Rio Vermelho) and penguin enclosures are directly under tree cover of Atlantic forest and less than 10 meters away from a large freshwater lake (Lagoa da Conceição), which provides an optimal environment for mosquito proliferation and close proximity to an abundant and diverse avifauna. Additionally, this facility rehabilitates not only marine animals but also terrestrial wildlife, including birds apprehended from illegal trafficking. The higher infection rate of MPs at this facility thus probably reflects not a difference in susceptibility or lineage virulence, but an increased probability of inoculation due to close contact with mosquitoes and avian reservoirs of infection.

6.5.2 *Plasmodium* lineages infecting penguins and their pathology

It has been generally accepted that *P. relictum* and *P. elongatum* are the two most significant species of *Plasmodium* that cause avian malaria in penguins (CLARKE; KERRY, 1993; JONES; SHELLAM, 1999a; QUILLFELDT et al., 2011), along with an isolated record of *P. juxtannucleare* (GRIM et al., 2003). Our results contrast this perception, demonstrating that a broad variety of *Plasmodium* species can be found in penguins undergoing rehabilitation in South America, including species that had not yet been demonstrated to infect penguins (*P. nucleophilum* and *P. cathemerium*). Regarding *P. cathemerium*, it is worth noting that even though we observed mature microgametocytes with well-defined elongated rod-shaped pigment granules with pointed ends (Appendix A), which are the defining features of *P. (Haemamoeba) cathemerium* (VALKIŪNAS, 2005), in all cases we also observed late trophozoites and young macrogametocytes with relatively large vacuoles surrounded by small round pigment granules and relatively small meronts with scanty cytoplasm, which are uncharacteristic to *P. cathemerium*. These findings may be interpreted as: (a) a host-specific morphological variation of *P. cathemerium*, (b) a variant or subspecies of *P. cathemerium*, (c) co-infection with a secondary unidentified lineage, or (d) a novel and yet undescribed *Plasmodium* species. Considering the molecular evidence indicating

high sequence identity and phylogenetic proximity with a reference lineage of *P. cathemerium*, however, we believe there is sufficient evidence to identify these lineages as *P. cathemerium*.

Furthermore, the phylogenetic tree suggests that one of the lineages corresponds to *P. unalis* (cluster D), which has not yet been recorded in penguins either. A number of lineages could not be identified (C, E, F, G and H), and probably some of these correspond to *Plasmodium* species that have not been reported in penguins as well. Such broad diversity of plasmodia lineages corroborates the interpretation that the infection of captive penguins results from local mosquitoes inoculating penguins with *Plasmodium* spp acquired from the native birds in the surrounding of the penguin exhibit (BEIER; STOSKOPF, 1980; CRANFIELD et al., 1994; GRACZYK et al., 1994; BUENO et al., 2010). The predominance of *P. relictum* in Europe and Asia and *P. relictum* and *P. elongatum* in North America therefore might not necessarily indicate a particular susceptibility of penguins to those species, but merely reflect their local abundance in those regions. It is worth noting that *P. cathemerium*, *P. elongatum*, *P. nucleophilum* and *P. relictum* are renowned as generalist parasites with low host-specificity, infecting avian species in several taxonomic orders (BENNETT et al., 1993).

Even though penguins seem to be susceptible to infection by a variety of *Plasmodium* lineages occurring regionally, that is not to say that all lineages have similar epidemiology or pathogenicity. In this study we found that *P. tejeraei* and *P. cathemerium* were lethal to respectively 73% and 33% in which they were detected, whilst other lineages had only a few cases recorded and/or could not be demonstrated as the leading factor causing death. These findings, combined with previous indications that albeit less frequent *P. relictum* tends to produce more severe disease than *P. elongatum* in penguins (BEIER; STOSKOPF, 1980; GRACZYK et al., 1994), raises the question on whether the subgenus *Haemamoeba* is more pathogenic to these birds than other plasmodia subgenera. Comparative pathology through experimental inoculation in laboratory birds may assist in clarifying whether pathogenicity is intrinsically higher for these lineages or if it reflects a susceptibility bias of penguins.

Overall, however, the histopathological lesions herein observed were generally consistent among lineages. The most prominent pathological processes were

granulocytic pneumonia and splenitis and mononuclear hepatitis that was probably the effect of vasculitis associated with the proliferation of *Plasmodium* within endothelial cells in multiple tissues, particularly in the lungs, spleen and liver; in most cases death likely culminated as a result of respiratory insufficiency from the marked pneumonia, congestion and edema. These lesions are not unlike those observed in *P. relictum* and *P. elongatum* infections in penguins in zoos and aquaria in the Northern hemisphere (FLEISCHMAN et al., 1968a; FIX et al., 1988; KO et al., 2008). The only exception was a MP deceased with a *P. nucleophilum* infection, in which no exoerythrocytic meronts were present but a large number of intraerythrocytic parasites were observed within blood vessels, suggesting a distinct pathogenesis. Future studies will be welcome to clarify whether this is a consistent pattern for *P. nucleophilum* infections in penguins and which pathophysiological mechanisms are involved.

6.5.3 Concurrent diseases

Two of the *Plasmodium*-positive MPs identified in this study had also been identified as *Avipoxvirus* positive in a previous study (Appendix C) (NIEMEYER et al., 2013). This probably occurs occasionally as both are mosquito-borne pathogens, however, it can confuse interpretation of pathological findings due to overlapping lesions; in particular, the only two individuals with necrotizing splenitis in Niemeyer et al. (2013) were *Plasmodium*-positive, indicating this lesion is most likely related to avian malaria and not poxvirosis. Other concurrent diseases included aspergillosis, gastrointestinal helminthiasis, spleen amyloidosis, cholestasis, unidentified myocardium cysts, and helminthes in the lungs, liver, air sacs and skin. Some of these findings, such as aspergillosis and gastrointestinal helminthiasis have been previously reported in penguins with avian malaria (e.g. GRINER; SHERIDAN, 1967; FIX et al., 1988). However, there are no reports of helminthes in the respiratory system, skin or air sacs of MPs (CLARKE; KERRY, 1993). Furthermore, the myocardium cysts herein observed clearly were not *Plasmodium* and could correspond to either protozoan or metazoan

parasites. Additional studies will be conducted to clarify the identity and significance of these parasites.

6.5.4 Implications for rehabilitation and conservation

The prevention of avian malaria in penguins in Northern hemisphere zoos has largely relied on the oral administration of primaquine during summer (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2007). In Brazil, however, primaquine commerce is restricted by the government due to concerns of resistance development in human malaria, and is thus impossible to acquire for rehabilitation centers. As a result, these organizations are forced to favor other prevention strategies, namely the isolation of penguins from mosquitoes, which is often challenging and costly. Our findings provide a positive aspect of the epidemiology of avian malaria in penguins at rehabilitation centers, namely that the periods in which *Plasmodium* infections occur (summer) is directly opposite to the period in which there are most penguins in rehabilitation (winter). As a result, these facilities would benefit from narrowing their malaria-prevention efforts to a relatively smaller number of individuals (those received and/or maintained between October and April), becoming more cost-effective in the prevention and early diagnosis. This is a relevant implication not only for permanent rehabilitation efforts, but also for oil spill responses, when the physical and human resources required of malaria prevention, diagnosis and treatment may be substantial (WOLFAARDT et al., 2008).

A number of MPs herein examined were considered released despite having been *Plasmodium*-positive at some point. It must be considered that even non-parasitemic penguins can relapse if treated with corticosteroids – and presumably the same would occur if they became stressed – due to the persistence of exoerythrocytic meronts (CRANFIELD et al., 1994). Brossy et al. (1999) expressed concern on the potential of rehabilitation centers releasing APs with blood parasites, and perhaps this concern should be even greater for MPs considering that *Plasmodium* has yet to be recorded in the species in the wild. In the case of MPs, however, we reason that

because climate and environmental conditions are generally adverse and mosquitoes occur very scarcely in the southeastern coast of Argentina (MITCHELL; DARSIE, 1985; WRBU, 2014) and are absent at the Malvinas-Falkland Islands (MEDLOCK et al., 2010) the probability of *Plasmodium* spill-over from a rehabilitated to a wild penguin is probably very low. Even so, it is important to emphasize that pathogen spill-over to wild populations should remain a prime and critical concern for rehabilitation centers, and that even a low probability is nonetheless a significant risk to be considered and addressed.

REFERENCES

- BEIER, J. C.; STOSKOPF, M. K. The epidemiology of avian malaria in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of Zoo Animal Medicine**, v. 11, n. 4, p. 99-105, 1980.
- BEIER, J. C.; TRPIS, M. Incrimination of natural culicine vectors which transmit *Plasmodium elongatum* to penguins at the Baltimore Zoo. **Canadian Journal of Zoology**, v. 59, n. 3, p. 470-475, 1981.
- BENNETT, G. F.; BISHOP, M. A.; PEIRCE, M. A. Checklist of the avian species of *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 (Apicomplexa) and their distribution by avian family and Wallacean life zones. **Systematic Parasitology**, v. 26, p. 171-179, 1993.
- BENSCH, S.; HELLGREN, O.; PÉREZ-TRIS, J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. **Molecular Ecology Research**, v. 9, p. 1353-1358, 2009.
- BROSSY, J. J.; PLÖS, A. L.; BLACKBEARD, J. M.; KLINE, A. Diseases acquired by captive penguins: what happens when they are released into the wild? **Marine Ornithology**, v. 27, p. 185-186, 1999.
- BUENO, M. G.; LOPEZ, R. P. G.; MENEZES, R. M. T.; COSTA-NASCIMENTO, M. J.; LIMA, G. F. M. C.; ARAÚJO, R. A. S.; GUIDA, F. J. V.; KIRCHGATTER, K. Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo Zoo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1-2, p. 123-127, 2010.
- CLARKE, J. R.; KERRY, K. R. Diseases and parasites of penguins. **Korean Journal of Polar Research**, v. 4, n. 2, p. 79-96, 1993.
- CRANFIELD, M. R.; GRACZYK, T. K.; BEALL, F. B.; IALEGGIO, D. M.; SHAW, M. L.; SKJOLDAGER, M. L. Subclinical avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) and induction of parasite recrudescence. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, n. 3, p. 372-376, 1994.

FANTHAM, H. B.; PORTER, A. On a *Plasmodium* (*Plasmodium relictum* var. *spheniscidae*, n. var.), observed in four species of penguins. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 114, p. 279-292, 1944.

FIX, A. S.; WATERHOUSE, C.; GREINER, E. C.; STOSKOPF, M. K. *Plasmodium relictum* as a cause of avian malaria in wild-caught Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 4, p. 610-619, 1988.

FLEISCHMAN, R. W.; SQUIRE, R. A.; SLADEN, W. J. L.; MELBY Jr., E. C. Malaria (*Plasmodium elongatum*) in captive African penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 153, n. 7, p. 928-935, 1968b.

GERING, E.; ATKINSON, C. T. A rapid method for counting nucleated erythrocytes on stained blood smears by digital image analysis. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 879-881, 2004.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; McCUTCHAN, T. F.; BICKNESE, E. J. Characteristics of naturally acquired avian malaria infections in naive juvenile African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Parasitological Research**, v. 80, p. 634-637, 1994.

GRIM, K. C.; van der MERWE, E.; SULLIVAN, M.; PARSONS, N.; McCUTCHAN, T. F.; CRANFIELD, M. *Plasmodium juxtanucleare* associated with mortality in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 34, n. 3, p. 250-255, 2003.

GRINER, L. A.; SHERIDAN, B. W. Malaria (*Plasmodium relictum*) in penguins at the San Diego Zoo. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 1, p. 7-17, 1967.

HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 797-802, 2004.

JARVI, S. I.; SCHULTZ, J. J.; ATKINSON, C. T. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 153-158, 2002.

JONES, H. I.; SHELLAM, G. R. The occurrence of blood-inhabiting protozoa in captive and free-living penguins. **Polar Biology**, v. 21, p. 5-10, 1999a.

JONES, H. I.; SHELLAM, G. R. Blood parasites in penguins, and their potential impact on conservation. **Marine Ornithology**, v. 27, p. 181-184, 1999b.

KO, Kyeong-Nam; KANG, Sang-Chul; JUNG, Ji-Youl; BAE, Jong-Hee; KIM, Jae-Hoon. Avian malaria associated with *Plasmodium* spp. infection in a penguin in Jeju Island. **Korean Journal of Veterinary Research**, vol. 48, n. 2, p. 197-201, 2008.

LEVIN, I. I.; PARKER, P. G. Hemosporidian parasites: impacts on avian hosts. In: MILLER, E.; FOWLER, M. **Fowler's zoo and wild animals medicine**. Missouri: Elsevier Saunders, 2011. p. 356-363.

MARTINSEN, E. S.; PERKINS, S. L. The diversity of *Plasmodium* and other Haemosporidians: The interesection of taxonomy, phylogenetics and genomics. In: CARLTON, J. M.; PERKINS, S. L.; DEITSCH, K. W. **Malaria parasites: comparative genomics, evolution and molecular biology**. Norfolk: Caister Academic Press, 2013. p. 1-15.

MEDLOCK, J. M.; SCHAFFNER, F.; FONTENILLE, D. **Invasive mosquitoes in the European associate continental and overseas territories**. 2010. Disponível em: <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvice/_layouts/forms/Review_DispForm.aspx?ID=212&List=a3216f4c-f040-4f51-9f77-a96046dbfd72>. Acesso em: 16 feb. 2014.

MITCHELL, C. J.; DARSIE, R. F. Mosquitoes of Argentina: Part II. Geographic distribution and bibliography (Diptera, Culicidae). **Mosquito Systematics**, v. 17, n. 4, p. 279-360, 1985.

NIEMEYER, C.; FAVERO, C. M.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; BHERING, R. C. C.; BRANDÃO, P.; CATÃO-DIAS, J. L. Two different avipoxviruses associated with pox disease in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) along the Brazilian coast. **Avian Pathology**, v. 42, n. 6, p. 546-551, 2013.

PARSONS, N. J.; UNDERHILL, L. G. Oiled and injured African penguins *Spheniscus demersus* and other seabirds admitted for rehabilitation. **African Journal of Marine Science**, v. 27, n. 1, p. 289-296, 2005.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, p. 817-818, 1998.

REICZIGEL, J.; FÖLDI, J.; ÓZSVÁRI, L. Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. **Epidemiology and Infection**, v. 138, p. 1674-1678, 2010.

RODRIGUES, S. C.; ADORNES, A. C.; SANTOS-FILHO, E. A.; SILVA-FILHO, R. P.; COLARES, E. P. Surviving probability indicators of landing juvenile Magellanic penguins arriving along the southern Brazilian coast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 2, p. 419-424, 2010.

SILVA-FILHO, R. P.; RUOPPOLO, V. Sphenisciformes. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens** – medicina veterinária. São Paulo: Roca, 2007. p. 309-323.

SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; LACORTE, G. A.; KOLESNIKOVAS, C. K. M.; VANSTREELS, R. E. T.; STEINDEL, M.; CATÃO-DIAS, J. L.; VALKIŪNAS, G.; BRAGA, É. M. Parasitological and new molecular-phylogenetic characterization of the malaria parasite *Plasmodium tejeraei* in South American penguins. **Parasitology International**, v. 62, p. 165-171, 2013.

SLADEN, W. J. L.; GAILEY-PHIPPS, J. J.; DIVERS, B. J. Medical problems and treatment of penguins at the Baltimore Zoo. **International Zoo Yearbook**, v. 19, p. 202-209, 1979.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

VALKIŪNAS, G.; ZEHTINDJIEV, P.; DIMITROV, D.; KRIŽANAUSKIENĖ, A.; IEZHOVA, T. A.; BENSCH, S. Polymerase chain reaction-based identification of *Plasmodium* (*Huffia*) *elongatum*, with remarks on species identity of haemosporidian lineages deposited in GenBank. **Parasitological Research**, v. 102, p. 1185-1193, 2008.

VALKIŪNAS, G. **Avian malaria parasites and other haemosporidia**. Boca Ratón: CRC Press, 2005. 932 p.

WILLIAMS, T. D.; BOERSMA, P. D. Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). In: WILLIAMS, T. D. **The penguins**: Spheniscidae. Oxford: Oxford University Press, 1995. p. 249-258.

WOLFAARDT, A. C.; UNDERHILL, L. G.; ALTWEGG, R.; VISAGIE, J.; WILLIAMS, A. J. Impact of the Treasure oil spill on African penguins *Spheniscus demersus* at Dassen Island: case study of a rescue operation. **African Journal of Marine Science**, v. 30, n. 2, p. 405-419, 2008.

WRBU. WALTER REED BIOSYSTEMATICS UNIT. **VectorMap**: Know the vector, know the threat. 2014. Disponível em: <<http://www.vectormap.org/>>. Acesso em: 16 fev. 2014.

Appendix A - *Plasmodium* spp. in Giemsa-stained blood smears of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). Scale bar = 5 μ m

Source: Vanstreels (2014)

Legend: *P. nucleophilum* (CRAM2127): (a,b) trophozoites, (c,d) meronts, (e) coinfection by erythrocytic meront and microgametocyte, (f) macrogametocyte, (g) microgametocyte, (h) co-infection by macro and microgametocyte; *P. cathemerium* (CRAM1923): (i) trophozoite, (j,k) meronts, (l-n) macrogametocytes, (o,p) microgametocytes

Appendix B - Summary of the rehabilitation and clinical parameters *Plasmodium*-positive Magellanic penguins undergoing rehabilitation along the coast of Brazil

Band number	Location	Date of admission	Date of exit	Date of first positive sample	Exit	Age group	Oiling	Sex	Body mass on admission (g)	Body mass on exit (g)	Hematocrit on admission (%)	Hematocrit on exit (%)	Plasma protein on admission (g/dL)	Plasma protein on exit (g/dL)
CRAM1886	Bahia	03/10/08	03/04/09	12/10/08	Released	Juvenile	No	-	3112	3702	39	37	8	10
CRAM1923	Bahia	03/10/08	03/04/09	12/10/08	Released	Juvenile	No	-	4028	4614	46	50	6.6	9
CRAM2278	Bahia	22/11/10	07/12/10	23/11/10	Released	Juvenile	No	F	3810	-	41	-	7.2	-
CRAM2289	Bahia	22/11/10	07/12/10	23/11/10	Released	Juvenile	No	M	3673	-	44	-	8.2	-
CRAM1935	Espirito Santo	03/10/08	03/04/09	12/10/08	Released	Juvenile	No	-	3266	4070	44	41	7.6	7.4
ES114	Espirito Santo	01/08/12	27/01/13	27/01/13	Deceased	Juvenile	No	F	2260	3555	-	-	-	-
ES167	Espirito Santo	10/08/12	24/12/12	24/12/12	Euthanized	Juvenile	No	F	1915	3800	-	-	-	-
RJ128	Espirito Santo	23/10/12	04/01/13	04/01/13	Deceased	Juvenile	No	F	2050	2755	-	-	-	-
CRAM0580	Rio de Janeiro	04/09/00	14/04/01	14/04/01	Deceased	Juvenile	No	-	3890	-	36	-	-	-
CRAM1229	Rio de Janeiro	13/11/05	30/01/06	30/01/06	Deceased	Juvenile	No	F	2910	2650	33	13	7.6	8.5
IF503	Santa Catarina	20/11/08	07/04/09	25/03/09	Deceased	Juvenile	No	-	3000	3550	-	40	-	-
IF504	Santa Catarina	17/12/08	10/04/09	25/03/09	Released	Juvenile	No	-	-	4000	-	44	-	-
IF506	Santa Catarina	19/11/08	27/03/09	25/03/09	Deceased	Juvenile	No	M	2400	3960	-	32	-	-
IF507	Santa Catarina	28/10/08	10/04/09	25/03/09	Released	Juvenile	No	-	-	4160	-	45	-	-
IF508	Santa Catarina	07/01/09	07/04/09	25/03/09	Deceased	Juvenile	No	-	2800	3630	-	32	-	-
IF511	Santa Catarina	14/11/08	10/04/09	25/03/09	Released	Juvenile	No	-	2400	3280	-	35	-	-
IF512	Santa Catarina	15/11/08	10/04/09	25/03/09	Released	Juvenile	No	-	-	5520	-	35	-	-
IF516	Santa Catarina	15/11/08	10/04/09	05/04/09	Released	Juvenile	No	-	-	3960	-	20	-	-
IF517	Santa Catarina	01/12/08	10/04/09	25/03/09	Released	Juvenile	No	-	-	3760	-	20	-	-
IF518	Santa Catarina	03/12/08	29/03/09	25/03/09	Deceased	Juvenile	No	-	-	3330	-	28	-	-
IF520	Santa Catarina	04/11/08	29/03/09	25/03/09	Deceased	Juvenile	No	-	2500	2580	-	-	-	-
IF584	Santa Catarina	19/11/08	23/03/09	23/03/09	Deceased	Juvenile	No	-	2600	4120	-	-	-	-
IF588	Santa Catarina	17/12/08	10/04/09	25/03/09	Released	Juvenile	No	-	-	4250	-	38	-	-

Band number	Location	Date of admission	Date of exit	Date of first positive sample	Exit	Age group	Oiling	Sex	Body mass on admission (g)	Body mass on exit (g)	Hematocrit on admission (%)	Hematocrit on exit (%)	Plasma protein on admission (g/dL)	Plasma protein on exit (g/dL)
IF589	Santa Catarina	28/01/09	29/03/09	25/03/09	Deceased	Juvenile	No	-	-	3460	-	40	-	-
IF590	Santa Catarina	17/12/08	23/03/09	25/03/09	Released	Juvenile	No	-	-	3450	-	38	-	-
IF593	Santa Catarina	11/03/09	23/03/09	23/03/09	Deceased	Juvenile	No	-	3450	3440	-	-	-	-
W16437	Santa Catarina	25/10/08	19/06/09	25/03/09	Transferred	Juvenile	No	-	4100	4750	-	32	-	-
F1055	Santa Catarina	01/02/10	31/07/10	12/03/09	Deceased	Juvenile	No	-	2650	-	-	-	-	-
F1060	Santa Catarina	09/03/10	28/04/10	28/04/10	Deceased	Adult	No	-	3230	-	-	-	-	-
R0040	Santa Catarina	07/08/10	20/11/10	20/11/10	Deceased	Adult	No	F	3300	2890	-	55	-	6
R0091	Santa Catarina	26/01/11	14/02/11	16/02/11	Deceased	Juvenile	No	M	2100	-	-	-	-	-
R0092	Santa Catarina	26/01/11	18/08/11	16/02/11	Released	Adult	No	F	3200	1870	-	42	-	6.7
R0093	Santa Catarina	17/02/11	18/04/11	18/04/11	Deceased	Adult	No	F	3220	-	-	-	-	-
R0263	Santa Catarina	11/10/12	22/03/13	22/03/13	Euthanized	Juvenile	No	M	3060	2590	-	27	-	-
R0268	Santa Catarina	06/11/12	20/03/13	20/03/13	Euthanized	Juvenile	No	F	2700	-	-	19	-	-
R0272	Santa Catarina	08/11/12	07/01/13	07/01/13	Deceased	Juvenile	No	M	3240	2990	-	-	-	-
R0282	Santa Catarina	05/12/12	30/12/12	07/01/13	Deceased	Adult	No	M	3260	3275	-	-	-	-
R0284	Santa Catarina	17/12/12	20/03/13	20/03/13	Euthanized	Juvenile	No	F	2560	2715	-	44	-	-
R0290	Santa Catarina	07/01/13	20/03/13	07/01/13	Deceased	Juvenile	No	M	-	2910	-	40	-	-
CRAM0628	Rio Grande do Sul	07/07/01	19/11/01	19/11/01	Deceased	Juvenile	Yes	-	2645	4000	53	47	-	-
CRAM0630	Rio Grande do Sul	01/08/01	27/11/01	27/11/01	Deceased	Adult	Yes	F	2750	3350	-	49	-	-
CRAM2125	Rio Grande do Sul	18/10/09	14/12/09	14/12/09	Deceased	Juvenile	Yes	F	2810	2942	40	41	4.8	6.2
CRAM2126	Rio Grande do Sul	20/10/09	21/02/10	21/02/10	Deceased	Juvenile	Yes	F	2586	3250	41	49	6.1	6.1
CRAM2127	Rio Grande do Sul	20/10/09	19/02/10	19/02/10	Deceased	Juvenile	Yes	F	2802	2554	50	16	6	7.6

Appendix C - Summary of the diagnostic results of *Plasmodium*-positive Magellanic penguins undergoing rehabilitation along the coast of Brazil

Band number	Screening method	Histopathology	Blood smear morphology	Phylogenetic cluster (GenBank number)	Final identification	Concurrent disease and/or other significant lesions
CRAM1886	TBS	-	<i>P. nucleophilum</i> + <i>P. cathemerium</i>	-	<i>P. nucleophilum</i> + <i>P. cathemerium</i>	-
CRAM1923	TBS+PCR	-	<i>P. cathemerium</i>	B (KJ577720)	<i>P. cathemerium</i>	-
CRAM2278	TBS+PCR	-	-	F (KJ577724)	<i>Plasmodium</i> sp F	-
CRAM2289	TBS+PCR	-	<i>P. nucleophilum</i>	I (KJ577725)	<i>P. nucleophilum</i>	-
CRAM1935	TBS	-	<i>P. cathemerium</i>	-	<i>P. cathemerium</i>	-
ES114	TBS+PCR	Positive (EEM)	Negative	J (KJ577717)	<i>P. elongatum</i>	Choleostasis, unidentified parasite cysts within myocardium
ES167	TBS+PCR	Positive (EEM)	Negative	B (KJ577718)	<i>P. cathemerium</i>	Aspergillosis
RJ128	PCR	Positive (EEM)	-	B (KJ577719)	<i>P. cathemerium</i>	-
CRAM0580	HP	Positive (EEM, IEP)	-	-	<i>Plasmodium</i> sp	-
CRAM1229	HP	Positive (EEM)	-	-	<i>Plasmodium</i> sp	-
IF503	TBS+PCR	Not examined	<i>P. (Haemamoeba)</i> sp	A (KJ575551)	<i>P. tejera</i>	-
IF504	TBS+PCR	-	Negative	seq. unsuccessful	<i>Plasmodium</i> sp	-
IF506	TBS+PCR	Positive (EEM)	<i>P. tejera</i>	A (JX272844)	<i>P. tejera</i>	-
IF507	TBS+PCR	-	Negative	A (KJ575544)	<i>P. tejera</i>	-
IF508	TBS+PCR	Not examined	<i>P. elongatum</i> + <i>P. tejera</i>	A (HQ59136), J (KJ575552)	<i>P. elongatum</i> + <i>P. tejera</i>	-
IF511	TBS+PCR	-	Negative	A (KJ575545), seq. unsuccessful	<i>P. tejera</i> + <i>Plasmodium</i> sp	-
IF512	TBS+PCR	-	Negative	A (KJ575546)	<i>P. tejera</i>	-
IF516	TBS+PCR	-	<i>Plasmodium</i> sp	B (KJ575553)	<i>P. cathemerium</i>	-
IF517	TBS+PCR	-	<i>P. elongatum</i> + <i>P. (Haemamoeba)</i> sp	-	<i>P. elongatum</i> + <i>P. (Haemamoeba)</i> sp	-
IF518	TBS+PCR	Not examined	Negative	A (KJ575547)	<i>P. tejera</i>	-
IF520	TBS+PCR	Not examined	<i>P. tejera</i>	A (HQ591361)	<i>P. tejera</i>	-
IF584	TBS	Positive (EEM)	<i>P. tejera</i>	-	<i>P. tejera</i>	-
IF588	TBS+PCR	-	<i>P. elongatum</i> + <i>P. (Haemamoeba)</i> sp	seq. unsuccessful	<i>P. elongatum</i> + <i>P. (Haemamoeba)</i> sp	-
IF589	TBS+PCR	-	Negative	A (KJ575548)	<i>P. tejera</i>	-
IF590	TBS+PCR	-	<i>P. tejera</i>	A (KJ575549)	<i>P. tejera</i>	-
IF593	TBS	Positive (EEM)	<i>P. tejera</i>	-	<i>P. tejera</i>	-

Band number	Screening method	Histopathology	Blood smear morphology	Phylogenetic cluster (GenBank number)	Final identification	Concurrent disease and/or other significant lesions
W16437	TBS+PCR	-	Negative	A (KJ575550)	<i>P. tejera</i>	-
F1055	TBS+PCR	-	Negative	A (KJ577726)	<i>P. tejera</i>	-
F1060	TBS+PCR	Positive (EEM)	Negative	A (KJ577727)	<i>P. tejera</i>	-
R0040	TBS+PCR	Positive (EEM)	Negative	A (KJ577728)	<i>P. tejera</i>	Helminths (small intestine)
R0091	PCR	Positive (EEM)	-	A (KJ577729)	<i>P. tejera</i>	-
R0092	TBS+PCR	-	<i>P. (Haemamoeba) sp</i>	B (KJ577730)	<i>P. cathemerium</i>	-
R0093	PCR	Positive (EEM)	-	E (KJ577731)	<i>Plasmodium sp E</i>	-
R0263	PCR	Positive (EEM)	-	G (KJ577732)	<i>Plasmodium sp G</i>	Splenic amyloidosis, helminths (air sacs)
R0268	PCR	Positive (EEM)	-	G (KJ577733)	<i>Plasmodium sp G</i>	Avipoxvirus, necrotizing pancarditis associated with aspergillosis
R0272	PCR	Positive (EEM)	-	B (KJ577734)	<i>P. cathemerium</i>	Avipoxvirus
R0282	PCR	Positive (EEM)	-	H (KJ577735)	<i>Plasmodium sp H</i>	Helminth microfilariae (eyelid dermis)
R0284	PCR	Negative	-	B (KJ577736)	<i>P. cathemerium</i>	Helminths (cloacal epidermis)
R0290	PCR	Positive (EEM)	-	B (KJ577737)	<i>P. cathemerium</i>	-
CRAM0628	HP	Positive (EEM)	-	-	<i>Plasmodium sp</i>	-
CRAM0630	HP	Positive (EEM)	-	-	<i>Plasmodium sp</i>	-
CRAM2125	TBS+PCR	Negative	Negative	D (KJ577721)	<i>Plasmodium sp D</i>	Aspergillosis, spleen amyloidosis
CRAM2126	TBS+PCR	-	Negative	C (KJ577722)	<i>Plasmodium sp C</i>	-
CRAM2127	TBS+PCR	Positive (IEP)	<i>P. nucleophilum</i>	I (KJ577723)	<i>P. nucleophilum</i>	Splenic amyloidosis, helminths (intravascular in small intestine, interstitial in lungs and liver)

Legend: TBS – thin blood smears, PCR – nested polymerase chain reaction, HP – histopathology, EEM – exoerythrocytic meronts, IEP – intraerythrocytic parasites

7 INVESTIGATION OF BLOOD PARASITES OF PYGOSCELID PENGUINS AT THE KING GEORGE AND ELEPHANT ISLANDS, SOUTH SHETLANDS ARCHIPELAGO, ANTARCTICA

7.1 ABSTRACT

Parasites may adversely affect the breeding success and survival of penguins, potentially hampering the viability of their populations. We examined 161 pygoscelid penguins (3 *Pygoscelis adeliae*, 98 *Pygoscelis antarcticus*, and 60 *Pygoscelis papua*) at the South Shetlands Archipelago during the 2010–2011 summer; blood smears were examined for 64 penguins (2 *P. adeliae*, 18 *P. antarcticus*, and 44 *P. papua*), and a PCR test targeting *Haemoproteus* sp. and *Plasmodium* sp. was applied for 37 penguins (2 *P. adeliae*, 17 *P. antarcticus*, 19 *P. papua*). No blood parasites were observed, and all PCR tests were negative, leukocyte profiles were similar to those reported in other studies for wild pygoscelid penguins, and all penguins were in good body condition and had no external signs of disease. One specimen of chewing lice (*Austrogoniodes* sp.) was recorded in one *P. antarcticus* at King George Island. Ticks (*Ixodes uriae*) were not observed on the penguins, but were found on the ground near *P. antarcticus* nests at King George Island. The absence of avian blood parasites in Antarctic penguins is thought to result from the absence of competent invertebrate hosts in the climatic conditions. Predicted climate changes may redefine the geographic distribution of vector-borne pathogens, and therefore, the occurrence of blood parasites and their invertebrate hosts should be monitored regularly in Antarctic birds, particularly in the northernmost Antarctic Peninsula.

7.2 INTRODUCTION

Diseases and parasites may adversely affect breeding success and lead to the mortality of penguins, potentially hampering the viability of their populations (BARBOSA; PALACIOS, 2009). In particular, blood parasites are considered a potential threat to the conservation of penguins (JONES; SHELLAM, 1999). Blood parasites known to infect penguins include *Babesia peircei* (EARLÉ et al. 1993), *Borrelia* sp. (YABSLEY et al., 2012), *Haemoproteus* sp. (LEVIN et al., 2009), *Leucocytozoon tawaki* (ARGILLA et al., 2013), *Plasmodium* spp. (RODHAIN; ADRIANNE, 1952), *Trypanosoma eudyptulae* (JONES; WOEHLER, 1989), and microfilariae (MERKEL et al., 2007), all of which have been demonstrated or are thought to be transmitted by arthropods. Avian malaria (*Plasmodium* sp.) is considered most relevant due to its history of causing high-mortality outbreaks in captive penguins and episodic mortalities in wild penguins (JONES; SHELLAM, 1999). Mortality of wild penguins associated with *Leucocytozoon* sp. (ARGILLA et al., 2013) have also been reported, raising concerns on the potential significance of these parasites to penguin conservation.

While blood parasites have been reported in wild penguins in temperate and tropical regions, all studies to date have failed to detect blood parasites in penguins or other birds in the Antarctic (QUILLFELDT et al., 2011). There are very few records of blood parasites in sub-Antarctic birds, and these were obtained in migratory seabirds that most likely acquired the infection elsewhere, such as *Haemoproteus*-infected brown skuas (*Stercorarius antarcticus*) at South Africa (PARSONS et al., 2010), or involve tick-transmitted parasites such as *Hepatozoon* sp. in albatrosses (*Diomedea* spp.) at Bird Island (PEIRCE; PRINCE, 1980). The most southern record of blood parasites in penguins was provided by Laird (1950), who reported *Plasmodium relictum* in a yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*) at Campbell Island (52°32'S 169°9'E).

With the exception of these rare reports, the lack of blood parasites in the sub-Antarctic and Antarctic avifauna is considered to be due to an inability of their arthropod hosts to survive under such relatively cold and harsh environmental conditions (MERINO et al., 1997; JOVANI et al., 2001), although competition among competent

and non-competent ectoparasites could also play a role (MARTÍNEZ-ABRAÍN et al., 2004). Temperature may also be a limiting factor for the development of the protozoan parasites within the arthropod host (BENNING et al., 2002). Predicted climate changes are expected to produce poleward changes in the geographic distribution of arthropods and arthropod-transmitted pathogens (HARVELL et al., 2002), and regions such as sub-Antarctic islands and the Antarctic Peninsula can be predicted to be at higher risks of the emergence of conservation-threatening parasites such as avian malaria. In particular, the Antarctic Peninsula has been one of the regions with the most pronounced warming trends in the recent past (VAUGHAN et al., 2003) and is inhabited by large populations of *Pygoscelis* sp. penguins (WOEHLER, 1993). This is of particular concern as pygoscelid penguins are known to be highly susceptible to avian malaria (RODHAIN; ADRIANNE, 1952; GRINER; SHERIDAN, 1967).

Blood smear examination is the standard method for the detection of hemoparasites, while molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) are highly valuable to detect cases of chronic infections and low parasitemia (GARAMSZEGI, 2010). Blood smear examination also allows for differential erythrocyte and leukocyte counts, conveying indirect information on the general health status and the physiological and immune system responses to stress, reproduction, and pathogens (VLECK et al., 2000; CLARK et al., 2009). In this study, we present integrated results from physical examinations, blood smear examinations, and PCR to obtain information on the health status and parasites of pygoscelid penguins at the King George and Elephant Islands, South Shetlands Archipelago.

7.3 MATERIALS AND METHODS

A total 161 randomly selected adult penguins – 3 Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*), 98 Chinstrap penguins (*Pygoscelis antarcticus*), and 60 Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) – were examined between December 2010 and March 2011 at breeding colonies in five sites at the South Shetlands Archipelago: Keller Peninsula

(62°4'55"S 58°24'32"W), Chabrier Rock (62°11'13"S 58°17'50"W), Demay Point (62°12'25"S 58°27'7"W), and Thomas Point (62°10'23"S 58°28'31"W) at Admiralty Bay, King George Island, and Stinker Point, Elephant Island (61°13'20"S 55°21'35"W). Penguins were subjected to a rapid clinical examination for lesions and external signs of disease (general external aspect, respiratory frequency, oral mucosae, eyes and conjunctivae, limb and abdominal palpation, external lesions, cloaca). Ectoparasites were carefully visually inspected for and collected in ethanol 70%; lice were mounted and identified (CLAY, 1967; PALMA, 1978). Blood samples were collected from the metatarsal or jugular veins of 64 of these penguins from January 31 to February 8, 2011 (late chick-rearing and early molting): 2 Adelie penguins (Thomas Point), 18 Chinstrap penguins (7 at Keller Peninsula, 10 at Demay Point, and 1 at Thomas Point), and 44 Gentoo penguins (24 at Stinker Point, 18 at Keller Peninsula, and 2 at Thomas Point).

For each penguin, two thin blood smears were freshly prepared, then fixed in methanol and stained with Diff-Quick and Wright-Rosenfeld (ROSENFELD, 1947). Minimum 3×10^4 erythrocytes per animal were examined for blood parasites under 1000x magnification light microscopy. Differential leukocyte counts were conducted for 200 leukocytes, and pro-erythroblasts and erythroblasts were quantified as a percentage of the cells from the erythrocytic lineage (CLARK et al., 2009); the heterophil-to-lymphocyte ratio was calculated (VLECK et al., 2000). Additionally, for 37 of these penguins a small aliquot of blood was frozen for molecular testing: 2 Adelie penguins (Thomas Point), 17 Chinstrap penguins (6 at Keller Peninsula, 10 at Demay Point, and 1 at Thomas Point), and 19 Gentoo penguins (17 at Keller Peninsula, 2 at Thomas Point). DNA was extracted from the blood samples in the laboratory using a standard phenol/chloroform and proteinase K extraction followed by ethanol precipitation (SAMBROOK et al., 2001) and non-phenolic extraction (CARVALHO, 2010); DNA extraction was verified and quantified through Nanodrop 2000 spectrophotometry (ThermoScientific, Wilmington, USA). A nested PCR targeting sequences of the cytochrome b gene of *Haemoproteus* sp. and *Plasmodium* sp. was used, as described by Hellgren et al. (2004) (each reaction had 25 μ L, with 75 ng of sample DNA; first reaction with primers HaemNFI and HaemNR3, and second reaction with primers HaemF and HaemR2). Blood samples from chicken experimentally infected with

Plasmodium gallinaceum or raised in arthropod-free environments were used as positive and negative controls, respectively. Gel electrophoresis was conducted to visualize amplification products, using 3 % agarose gel, SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, USA), and a high-resolution imaging system (Gel Doc EZ System – Bio-Rad, Hercules, USA).

Mann-Whitney tests were used to compare relative leukocyte counts between Gentoo penguins sampled at Stinker Point and Keller Peninsula, and between Chinstrap and Gentoo penguins sampled at Keller Peninsula. Significance level was 0.05 for all tests. All research procedures were conducted under the Brazilian Antarctic Project (PROANTAR) and complying with the Scientific Committee on Antarctic Research (SCAR).

7.4 RESULTS

All penguins had no clinical signs of disease. One male chewing louse was present in a Gentoo penguin at Keller Peninsula, King George Island. We determined that louse belonged to the genus *Austrogoniodes*. No other ectoparasites were observed on the penguins. Even though not specifically searched for, one adult female tick *Ixodes uriae* was found amidst guano and rocks at Chabrier Rock, an islet with a breeding colony of approximately 800 Chinstrap penguins, 31 of which were examined and presented no ticks. No blood parasites were observed on the blood smears, and all PCR tests were negative. Differential leukocyte counts are presented in Table 7.1; results from Thomas Point are omitted due to the low sample sizes (2 *P. adeliae*, 1 *P. antarcticus*, and 2 *P. papua*). All animals had a few circulating polychromatic erythrocytes (<10%), which were abundant (approx. 20%) only in two Gentoo penguins. Erythroblasts and pro-erythroblasts were seen sporadically regardless of the abundance of polychromatic erythrocytes, having occurred in one Chinstrap penguin (6%) and in nine Gentoo penguins (20%). Significant differences between Gentoo penguins from Keller Peninsula and Stinker Point occurred in monocyte ($P = 0.007$), heterophil ($P = 0.039$), and lymphocyte counts ($P = 0.024$), but not in eosinophil ($P = 0.980$) and

basophil counts ($P = 0.919$). Significant differences between Chinstrap and Gentoo penguins from Keller Peninsula occurred in heterophil ($P = 0.001$), lymphocyte ($P = 0.001$), eosinophil ($P = 0.001$), and monocyte counts ($P = 0.036$), but not in basophil counts ($P = 0.759$).

Table 7.1 - Differential leukocyte counts (Mean $\pm$ S.D.) for penguins at Demay Point (DP), Keller Peninsula (KP) and Stinker Point (SP), January-February 2011

	Chinstrap penguins		Gentoo penguins	
	DP (n=10)	KP (n=7)	KP (n=18)	SP (n=24)
Heterophils (%)	47.6 $\pm$ 11.0	37.2 $\pm$ 3.8	52.3 $\pm$ 8.1	46.7 $\pm$ 9.0
Lymphocytes (%)	48.7 $\pm$ 11.3	59.8 $\pm$ 4.2	41.3 $\pm$ 7.6	47.0 $\pm$ 9.6
Eosinophils (%)	2.9 $\pm$ 2.7	1.1 $\pm$ 0.7	5.1 $\pm$ 2.7	5.7 $\pm$ 4.0
Basophils (%)	0.2 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.5
Monocytes (%)	0.7 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 1.4	0.3 $\pm$ 0.5
Heterophil-to-Lymphocyte Ratio	1.09 $\pm$ 0.59	0.63 $\pm$ 0.11	1.33 $\pm$ 0.40	1.08 $\pm$ 0.46

7.5 DISCUSSION

Austrogoniodes spp. chewing lice and *I. uriae* ticks are common parasites of sub-Antarctic and Antarctic penguins, including at the South Shetlands Archipelago (BARBOSA et al., 2011). We were not able to identify the species of the recovered *Austrogoniodes* louse because its reproductive tract was damaged; however, it is most likely to be *Austrogoniodes gressitti* (see CLAY, 1967). While it is unknown whether *Austrogoniodes* spp. are competent hosts or vectors to any of the blood parasites recorded so far on penguins, *I. uriae* is thought to play a key role in the transmission of *Babesia peircei* and *Borrelia* sp. to penguins (EARLÉ et al., 1993; YABSLEY et al., 2012) and between penguins and long-distance migrating seabirds such as skuas and storm petrels (OLSÉN et al., 1995). Our results suggest an overall low prevalence and intensity of infection by *Austrogoniodes* sp. and *I. uriae* in pygoscelid penguins at the sampling sites; however, this may be an underestimate associated with visual inspection (CLAYTON; DROWN, 2001). In some instances, extreme parasitism by *I. uriae* has

been shown to hamper reproduction or lead to mortality (GAUTHIER-CLERC et al., 1998; MANGIN et al., 2003). We observed no apparent signs of disease or negative effects from ectoparasitism (which does not exclude the possibility of subclinical disease); however, it is also possible that sick individuals skipped breeding and/or were distributed elsewhere within the breeding colonies and could therefore have been less likely to be sampled in the study.

Low but statistically significant differences were observed in the leukocyte profiles among localities and penguin species, particularly in the heterophil, lymphocyte, and monocyte counts. Low-level changes in leukocyte differential counts could potentially reflect differences in exposure to and resultant physiological changes associated with microbial infections, parasites, stress, and breeding (VLECK et al., 2000; CLARK et al., 2009). However, as all relative leukocyte counts were similar to those observed in other studies in wild pygoscelid penguins (e.g., HAWKEY et al., 1989; VLECK et al., 2000) and both erythrocyte and leukocyte results were well within the reference values for healthy individuals of other avian species (see CLARK et al., 2009), it is difficult to determine the biological significance, if any, of the observed differences. The heterophil-to-lymphocyte ratios observed in this study for Chinstrap and Gentoo penguins (mean 0.63 – 1.33) were considerably lower than those reported by other authors for captive penguins (mean > 1.8) (HAWKEY et al., 1985; ISIS, 2002), and this may reflect stress – as occurs in captivity – is known to significantly increase absolute and relative heterophil counts (VLECK et al., 2000).

The absence of avian blood parasites in this and in previous studies should not dissuade future studies in the sub-Antarctic and Antarctic region. The emergence of pathogens in regions where they had been historically absent can have profound ecological and conservation consequences, as exemplified by the population decreases and extinctions of native Hawaiian birds during the twentieth century following the introduction of avian malaria and poxvirus (ATKINSON; LAPOINTE, 2009). More recently, the introduction of avian malaria to the Galápagos Islands has raised great concern on the potential implications for the conservation of the Galápagos penguin (*Spheniscus mendiculus*) and other endemic birds (LEVIN et al., 2009). Because penguins are remarkably susceptible to avian malaria (JONES; SHELLAM, 1999), a

climate change-induced emergence of this disease in sub-Antarctic and Antarctic regions could have dramatic consequences. Furthermore, tick-transmitted pathogens such as *Babesia* sp. or *Hepatozoon* sp. can also be expected to better thrive in these regions if they became warmer. It is therefore important to investigate and monitor these pathogens in the sub-Antarctic and Antarctic region to assure their early detection if ever they are to occur. The South Shetlands Archipelago, because of their relatively mild climate and geographic positioning close to the northern tip of the Antarctic Peninsula, is a strategic location for monitoring these parasites. In this context, it will be important for the Antarctic programs, including that of Brazil (PROANTAR), to develop and maintain consistent and long-term monitoring of the wildlife health in the region.

REFERENCES

- ARGILLA, L. S.; HOWE, L.; GARTRELL, D.; ALLEY, M. R. High prevalence of *Leucocytozoon* spp. in the endangered yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*) in the sub-Antarctic regions of New Zealand. **Parasitology**, v. 140, n. 5, p. 672-682, 2013.
- ATKINSON, C. T.; LAPOINTE, D. A. Introduced avian diseases, climate change, and the future of Hawaiian honeycreepers. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, n. 1, p. 53-63, 2009.
- BARBOSA, A.; PALACIOS, M. J. Health of Antarctic birds: a review of their parasites, pathogens and diseases. **Polar Biology**, v. 32, p. 1095-1115, 2009.
- BARBOSA, A.; BENZAL, J.; VIDAL, V.; D'AMICO, V.; CORIA, N.; DIAZ, J.; MOTAS, M.; PALACIOS, M. J.; CUERVO, J. J.; ORTIZ, J.; CHITIMIA, L. Seabird ticks (*Ixodes uriae*) distribution along the Antarctic peninsula. **Polar Biology**, v. 34, p. 1621-1624, 2011.
- BENNING, T. L.; LAPOINTE, D.; ATKINSON, C. T.; VITOUSEK, P. M. Interactions of climate change with biological invasions and land use in the Hawaiian Islands: modeling the fate of endemic birds using a geographic information system. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 99, p. 14246-14249, 2002.
- CARVALHO, A. L. **Estudo de um polimorfismo no gene da cadeia pesada b da miosina (CPbM)**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2010. Disponível em: <<https://woc.uc.pt/zoologia/getFile.do?tipo=2&id=5273>>. Acesso em: 11 jun. 2013.
- CLARK, P.; BOARDMAN, W.; RAIDAL, S. **Atlas of clinical avian hematology**. Oxford: Blackwell, 2009. 184 p.
- CLAY, T. Mallophaga (biting lice) and Anoplura (sucking lice) Part I: *Austrogoniodes* (Mallophaga) parasitic of penguins (Sphenisciformes). In: GRESSITT, J. L. **Entomology of Antarctica**. Washington: American Geophysical Union, 1967. p. 149-155.
- CLAYTON, D. H.; DROWN, D. M. Critical evaluation of five methods for quantifying chewing lice (Insecta: Phthiraptera). **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1291-1300, 2001.

EARLÉ, R. A.; HUCHZERMEYER, F. W.; BENNETT, G. F.; BROSSY, J. J. *Babesia peircei* sp. nov. from the jackass penguin. **African Zoology**, v. 28, n. 2, p. 88-90, 1993.

GARAMSZEGLI, L. Z. The sensitivity of microscopy and PCR-based detection methods affecting estimates of prevalence of blood parasites in birds. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1197-1203, 2010.

GAUTHIER-CLERC, M.; CLERQUIN, Y.; HANDRICH, Y. Hyperinfestation by ticks *Ixodes uriae*: a possible cause of death in adult king penguins, a long-lived seabird. **Colonial Waterbirds**, v. 21, p. 229-233, 1998.

GRINER, L. A.; SHERIDAN, B. W. Malaria (*Plasmodium relictum*) in penguins at the San Diego Zoo. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 1, p. 7-17, 1967.

HARVELL, C. D.; MITCHELL, C. E.; WARD, J. R.; ALTIZER, S.; DOBSON, A. P.; OSTFELD, R. S.; SAMUEL, M. D. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. **Science**, v. 296, p. 2158-2162, 2002.

HAWKEY, C.; SAMOUR, H. J.; HENDERSON, G. M.; HART, M. G. Haematological findings in captive gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) with bumblefoot. **Avian Pathology**, v. 14, p. 251-256, 1985.

HAWKEY, C. M.; HORSLEY, D. T.; KEYMER, I. F. Haematology of wild penguins (Sphenisciformes) in the Falkland islands. **Avian Pathology**, v. 18, n. 3, p. 495-502, 1989.

HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 797-802, 2004.

ISIS. INTERNATIONAL SPECIES INFORMATION SYSTEM. **Reference ranges for physiological data values**. Apple Valley: ISIS, 2002.

JONES, H. I.; SHELLAM, G. R. Blood parasites in penguins, and their potential impact on conservation. **Marine Ornithology**, v. 27, p. 181-184, 1999.

JONES, H. I.; WOEHLER, E. J. A new species of blood trypanosome from little penguins (*Eudyptula minor*) in Tasmania. **Journal of Protozoology**, v. 36, n. 4, p. 389-390, 1989.

JOVANI, R.; TELLA, J. L.; FORERO, M. G.; BERTELLOTTI, M.; BLANCO, G.; CEBALLOS, O.; DONÁZAR, J. Á. Apparent absence of blood parasites in the Patagonian seabird community: is it related to the marine environment? **Waterbirds**, v. 24, p. 430-433, 2001.

LAIRD, M. Some blood parasites of New Zealand. **Zoological Publications of Victoria University College**, v. 5, p. 1-20, 1950.

LEVIN, I. I.; OUTLAW, D. C.; VARGAS, F. H.; PARKER, P. G. *Plasmodium* blood parasite found in endangered Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). **Biological Conservation**, v. 142, p. 3191-3195, 2009.

MANGIN, S.; GAUTHIER-CLERC, M.; FRENOT, Y.; GENDNER, J. P.; LE MAHO, Y. Ticks *Ixodes uriae* and the breeding performance of a colonial seabird, king penguin *Aptenodytes patagonicus*. **Journal of Avian Biology**, v. 34, p. 30-34, 2003.

MARTÍNEZ-ABRAÍN, A.; ESPARZA, B.; ORO, D. Lack of blood parasites in bird species: does absence of blood parasite vectors explain it all? **Ardeola**, v. 51, p. 225-232, 2004.

MERINO, S.; BARBOSA, A.; MORENO, J.; POTTI, J. Absence of haematozoa in a wild chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica* population. **Polar Biology**, v. 18, p. 227-228, 1997.

MERKEL, J.; JONES, H. I.; WHITEMAN, N. K.; GOTTDENKER, N.; VARGAS, H.; TRAVIS, E. K.; MILLER, R. E.; PARKER, P. G. Microfilariae in Galápagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) and flightless cormorants (*Phalacrocorax harrisi*). **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 3, p. 495-503, 2007.

OLSÉN, B.; DUFFY, D. C.; JAENSON, T. G. T.; GYLFE, A.; BONNEDAHL, J.; BERGSTRÖM, S. Transhemispheric exchange of Lyme disease spirochetes by seabirds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 3270-3274, 1995.

PALMA, R. L. Slide-mounting of lice: a detailed description of the Canada balsam technique. **New Zealand Entomologist**, v. 6, p. 432-436, 1978.

PARSONS, N. J.; PEIRCE, M. A.; STRAUSS, V. New species of haematozoa in Phalacrocoracidae and Stercorariidae in South Africa. **Ostrich**, v. 81, p. 103-108, 2010.

PEIRCE, M. A.; PRINCE, P. A. *Hepatozoon albatrossi* sp. nov. (Eucoccida: Hepatozoidae) from *Diomedea* spp. in the Antarctic. **Journal of Natural History**, v. 14, n. 3, p. 447-452, 1980.

QUILLFELDT, P.; ARRIERO, E.; MARTÍNEZ, J.; MASELLO, J. F.; MERINO, S. Prevalence of blood parasites in seabirds: a review. **Frontiers in Zoology**, v. 8, n. 26, 2011.

RODHAIN, J.; ANDRIANNE, V.-F. Deux nouveaux cas d'infestation par *Plasmodium* chez des pingouins. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 27, n. 6, p. 573-577, 1952.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica: Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.

SAMBROOK, K. J.; RUSSEL, D. W.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.

VAUGHAN, D. G.; MARSHALL, G. J.; CONNOLLEY, W. M.; PARKINSON, C.; MULVANEY, R.; HODGSON, D. A.; KING, J. C.; PUDSEY, C. J.; TURNER, J. Recent rapid regional climate warming on the Antarctic peninsula. **Climate Change**, v. 60, p. 243-274, 2003.

VLECK, C. M.; VERTICALINO, N.; VLECK, D.; BUCHER, T. L. Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adelie penguins. **Condor**, v. 102, p. 392-400, 2000.

WOEHLER, E. J. **The distribution and abundance of Antarctic and Subantarctic penguins**. Cambridge: Scientific Committee on Antarctic Research, 1993. 76 p.

YABSLEY, M. J.; PARSONS, N. J.; HORNE, E. C.; SHOCK, B. C.; PURDEE, M. Novel relapsing fever *Borrelia* detected in African penguins (*Spheniscus demersus*) admitted to two rehabilitation centers in South Africa. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1125-1130, 2012.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde o primeiro registro de malária aviária em um pinguim-rei na Sociedade Zoológica de Londres pelo Dr. H. Harold Scott, em 1927, um número crescente de registros desta enfermidade em Sphenisciformes tem sido publicados. No Brasil, há algumas décadas existem relatos anedóticos de malária aviária em pinguins-de-Magalhães em reabilitação e cativeiro na costa brasileira. Embora estes pinguins sejam reabilitados no Brasil anualmente às centenas ou milhares, nunca havia sido realizado um estudo detalhado da malária aviária nestas aves no país. Neste cenário, a medicina veterinária brasileira baseava-se exclusivamente na literatura acerca da malária aviária em pinguins cativos na América do Norte e Europa, assumindo que a enfermidade exibiria um comportamento epidemiológico e patológico semelhante no Brasil.

Nesta tese foi apresentada uma ampla investigação retrospectiva e prospectiva da ocorrência da malária aviária em pinguins-de-Magalhães em centros de reabilitação ao largo da costa brasileira. Os resultados revelam um perfil epidemiológico com algumas semelhanças àquele observado em pinguins cativos no Hemisfério Norte, em especial na sua ocorrência na forma de surtos. Estes surtos têm potencial para causar a morbidade e mortalidade de grande quantidade de animais em reabilitação, e seu desenvolvimento rápido requer que os centros de reabilitação estejam preparados antecipadamente para que tenham um sucesso significativo na mitigação dos seus impactos. A estreita sazonalidade desta enfermidade, cuja incidência restringe-se aos meses de outubro a abril, é um aspecto positivo para os centros de reabilitação uma vez que permite que estes concentrem seus esforços de prevenção e diagnóstico durante um período em que normalmente há um número relativamente pequeno de pinguins em reabilitação. Por outro lado, a constatação de que a enfermidade ocorre ao largo de toda a costa brasileira aparentemente sem um gradiente latitudinal significativo indica que a malária aviária deve ser prevenida e monitorada em pinguins em qualquer região do nosso país, inclusive no extremo sul.

Além do estudo epidemiológico geral, uma contribuição significativa deste estudo foi a ampliação do número de espécies de *Plasmodium* registradas em pinguins. Até então, apenas três espécies deste gênero haviam sido reportadas em pinguins, sendo *P. relictum* e *P. elongatum* classicamente consideradas como as mais relevantes. Através da combinação de técnicas morfológicas e biomoleculares foi possível agregar três novas espécies a esta lista, *P. tejerai*, *P. nucleophilum* e *P. cathemerium*. Assim, o estudo apresenta uma mudança de paradigma ao revelar que a diversidade de plasmódios aviários que podem infectar os pinguins é consideravelmente maior do que se imaginava, e que é provável que muitas outras espécies de *Plasmodium* spp. venham a ser registradas nestas aves no futuro.

Por outro lado, embora não existam colônias reprodutivas de pinguins na costa brasileira, nosso país tem a possibilidade de conduzir estudos científicos destas aves em seu ambiente reprodutivo. Embora o resultado deste estudo seja consistente com outros estudos que não detectaram hemoparasitas em pinguins na região Antártica e arquipélagos adjacentes, a execução de investigações desta natureza é importante para detectar não apenas uma potencial expansão da malária aviária às regiões mais austrais mas também para revelar a ocorrência de hemoparasitas veiculados por outros artrópodes. Em tempos de mudanças ambientais e climáticas abruptas, há muito se anteveem mudanças na distribuição de patógenos veiculados por artrópodes, e as populações de aves marinhas na região da Península Antártica podem ser um foco estratégico para o monitoramento de mudanças epidemiológicas.

Além destes estudos prospectivos e retrospectivos, a tese apresenta uma revisão e compilação dos aspectos da literatura científica acerca desta enfermidade e outras hemosporidioses, com uma abordagem voltada aos médicos veterinários atuando na reabilitação e manutenção em cativeiro de pinguins e outras aves no Brasil. À parte desta revisão de foco mais generalista, uma abordagem crítica e meta-análise de todas as publicações acerca da ocorrência de hemoparasitas intracelulares em pinguins permitiu agregar uma grande quantidade de informações que muitas vezes estão dispersas e fragmentadas. Esta revisão, juntamente com o estudos prospectivos e retrospectivos apresentados no restante da tese, estabelece um panorama mais claro da ocorrência das hemoparasitoses nestas aves e das suas implicações

epidemiológicas e para a conservação, fundamentando análises subsequentes e apontando as atuais lacunas de conhecimento.

Em suma, a malária aviária é uma enfermidade relevante para as mais diversas espécies de pinguins em todo o mundo e possui particular importância para a reabilitação e conservação destas aves no litoral brasileiro, merecendo maiores investigações no futuro.

APÊNDICE

Plasmodium (Haemamoeba) tejera

Anilha "IF-593"; 25/03/2009; Florianópolis, SC, Brasil. Giemsa; Barra de escala = 5 μ m

Legenda: (a-c) trofozoítos, (d-g) merontes, (h-j) macrogametócitos, (k,l) microgametócitos.

Plasmodium (Huffia) elongatum

Anilha "IF-508"; 25/03/2009; Florianópolis, SC, Brasil. Giemsa; Barra de escala = 5 μ m

Legenda: (a-d) trofozoítos, (e,f) merontes, (g) co-infecção por trofozoíto e meronte, (h-i) macrogametócitos, (j) co-infecção por dois macrogametócitos, (k,l) microgametócitos.

Plasmodium (Novyella) nucleophilum

Anilha "CRAM-1886"; 12/10/2009; procedente de Salvador, BA, Brasil; amostrado em Rio Grande, RS, Brasil. Giemsa; Barra de escala = 5 μ m

Legenda: (a-c) trofozoítos, (d-f) merontes, (g,h) macrogametócitos, (i,j) microgametócitos, (k) co-infecção por macrogametócito e microgametócito, (l) co-infecção por meront e microgametócito.

Plasmodium (Haemamoeba) cathemerium

Anilha "CRAM-1923"; 12/10/2009; procedente de Salvador, BA, Brasil; amostrado em Rio Grande, RS, Brasil. Giemsa; Barra de escala = 5 μ m

Legenda: (a-c) trofozoítos, (d-f) merontes, (g-i) macrogametócitos, (j-l) microgametócitos.