IGOR DA CUNHA LIMA ACOSTA

**Pesquisa de coccídios da família Sarcocystidae em
pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*)
encalhados na costa brasileira**

São Paulo

2017

IGOR DA CUNHA LIMA ACOSTA

Pesquisa de coccídios da família Sarcocystidae em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encalhados na costa brasileira

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Solange Maria Gennari

São Paulo

2017

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3532
FMVZ

Acosta, Igor da Cunha Lima
Pesquisa de coccídios da família Sarcocystidae em pinguins-de-magalhães
(*Spheniscus magellanicus*) encalhados na costa brasileira. / Igor da Cunha Lima
Acosta. — 2017.
67 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

1. Sarcocystis. 2. Toxoplasma. 3. Pinguins. 4. Brasil. I. Título.

São Paulo, 10 de maio de 2017

CEUA N 9701041113

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Solange Maria Gennari

Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal

Solange Maria Gennari (orientador)

Título da proposta: "Pesquisa de *Toxoplasma gondii* em Pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) no Estado do Espírito Santo."

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Final (versão de 03/maio/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Os objetivos propostos foram todos cumpridos? Resp: Em partes. Os resultados obtidos propiciaram a criação de novos projetos? Resp: Sim. 2. O N amostral proposto inicialmente foi suficiente? Qual o N amostral total alocado? Resp: Sim, 310 pinguins analisados. 3. Houve perdas? se sim, quantas? Resp: Não. 4. Ocorreu algum evento adverso durante a condução do estudo? Resp: Ausência de encalhe de pinguins no ano de 2014. 5. Resultados já apresentados em congresso? Resp: Sim 6. Resultados já publicados? Resp: ".

Comentário da CEUA: "Relatório aprovado."

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

ERRATA

ACOSTA, I. C. L. **Pesquisa de coccídios da família Sarcocystidae em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encalhados na costa brasileira.** [Research of coccidia of the Sarcocystidae family in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) stranded in the Brazilian coast]. 2017. 67 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Página

Onde se lê

Leia-se

RESUMO

Acosta, I. C. L. **Pesquisa de coccídios da família Sarcocystidae em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encalhados na costa brasileira.** Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

ACOSTA, I. C. L. **Pesquisa de coccídios da família Sarcocystidae em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encalhados na costa brasileira.** [Research of coccidia of the Sarcocystidae family in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) stranded in the Brazilian coast]. 2017. 67 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

ABSTRACT

Acosta, I. C. L. **Research of coccidia of the Sarcocystidae family in magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) stranded in the Brazilian coast.** [Pesquisa de coccídios da família Sarcocystidae em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encalhados na costa brasileira]. 2017. 67 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

ACOSTA, I. C. L. **Research of coccidia of the Sarcocystidae family in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) stranded in the Brazilian coast.** [Pesquisa de coccídios da família Sarcocystidae em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encalhados na costa brasileira]. 2017. 67 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ACOSTA, Igor da Cunha Lima

Título: Pesquisa de coccídios da família Sarcocystidae em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encalhados na costa brasileira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses 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 trabalho ao meu querido amigo Danilo Gonsalves Saraiva (in memoriam), um exemplo de ser humano, amigo e admirável pesquisador que sempre estará vivo em nossos corações;

Dedico a toda minha família e amigos como forma de agradecimento, reconhecimento, apoio e confiança depositada em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e saúde;

À minha esposa Luana D'Ávila Centoducatte pelo carinho, amizade, apoio, confiança, pois mesmo longe, mostrou-me que podemos ser uma família;

Agradeço aos meus pais, Eliane da Cunha Lima Acosta e Sideram de Lima Acosta, por terem aceitado minha profissão com muita paciência, por me criarem com tanto amor e carinho, pelos conselhos, pelos esforços e sacrifícios para que este momento fosse possível. Ao meu irmão, Iuri da Cunha Lima Acosta, pelo apoio em minhas decisões e pelos conselhos;

Aos meus queridos avós: Neyde da Cunha Lima, Antônia de Lima Acosta, Osmar Santos Lima e Adalciro Machado Acosta, meus sinceros agradecimentos pois são fontes de experiência e inspiração;

Aos meus sogros, Reinaldo Centoducatte e Rosângela D'Ávila pelas orientações, momentos agradáveis e familiares;

À querida professora Dra. Solange Maria Gennari pela orientação, pelos ensinamentos, amizade, apoio oferecido, oportunidade, confiança e uma memória invejável;

Ao professor Dr. Macelo Bahia Labruna pela amizade, pelos seus constantes ensinamentos no decorrer das jornadas de laboratório, pesquisas de campo e por proporcionar momentos únicos de alegria;

Ao Dr. Rodrigo Soares Martins pelos valiosos ensinamentos e direta colaboração neste estudo;

A toda equipe e colaboradores do Instituto de Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos (IPRAM), especialmente Luís Felipe Mayorga e Renata Bhering;

Aos amigos Emy Hiura, Fabio Porto Sena e Nathielle Pedroto pela ajuda direta no decorrer das pesquisas de campo;

À Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena pelos valiosos ensinamentos, paciência e experiência;

Ao Dr. Arlei Marcili pela orientação, oportunidade e confiança na época do mestrado, me preparando para os desafios do doutorado.

Aos professores Dr. João Luiz Rossi Júnior e Dra. Flaviana Guião Leite pelo

incentivo inicial a pesquisa;

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) que contribuíram de forma significativa para a minha formação;

A todos os professores da Universidade de Vila Velha (UVV) que contribuíram de forma significativa para a minha formação no ensino superior;

Aos amigos Herbert Soares, Jonas Moraes Filho, Amália Barbieri, Felipe Krawczak, Thiago Martins, Diego Ramirez, Hermes Luz, Gabriel Landulfo, Jairo Mendoza-Roldan, Sebastian Muñoz-Leal; Alejandro Hernández, Hector Benatti, Carolina Serpa, Sergio Vittaliano, Solange Oliveira, Marcos Lopez, Marina Ferreira, Bruna Alves, Ana Beatriz Cassinelli, Ryan Emiliano, Amanda Sousa, Gislene Fournier, Tatiana Ueno, João Fabio Soares, Francisco Costa, Ricardo Arrais, Carlos Prudêncio, Mariana Spolidorio, Eveline Zuniga, Juliana Aizawa, Aline Diniz, Monize Gerardi, Ferndanda Nieri-Bastos, Washington Agostino, Andréa P. Costa, Silvio de Souza Adriano Pinter dos Santos, Maria Ogrzewalska, Júlia Lima e Danilo Saraiva pela amizade, companhia, convívio, por proporcionarem um ambiente agradável e familiar durante esses anos.

A todos os funcionários do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) da FMVZ/USP que direta ou indiretamente contribuíram para minha adaptação e aprendizado nesta jornada, especialmente a Pedro Ferreira da Silva, Renato Cara Vieri, Márcio Chiacchio e Antônio Rodrigues.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e a todos os seus funcionários, especialmente a Danival Lopes Moreira e Cristina Paick.

A todos os professores, funcionários e amigos que contribuíram no meu ensino básico para fazer com que chegasse até esse momento: Colégio O Quintal (Campo Grande-MS), Oswaldo Tognini (Campo Grande-MS), Americano Batista (Vila Velha – ES), Adventista do íbis (Vila Velha – ES), Centro Educacional Integrado Capixaba-CEIC (Vila Velha – ES), Divino Salvador (Jundiá – SP)

À FAPESP pelo auxílio financeiro processo 2013/25303-6

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer” (Albert Einstein)

RESUMO

Acosta, I.C.L. **Pesquisa de coccídios da família Sarcocystidae em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encalhados na costa brasileira.** Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O gênero *Sarcocystis* é constituído por várias espécies que se diferenciam pelas características morfológicas, biológicas e moleculares. Foram relatadas mais de 196 espécies encontradas em mamíferos, aves e répteis e somente 26 dessas espécies possuem o ciclo completo conhecido. *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório, com distribuição geográfica cosmopolita, capaz de infectar uma ampla variedade de mamíferos e aves, inclusive o homem, caracterizando seu potencial zoonótico. Nas últimas décadas, a quantidade de pinguins vindos da Patagônia argentina e chilena, região de nascimento dessas aves, para o litoral brasileiro, onde muitos encalham e são resgatados, tem aumentado significativamente. Pouco se sabe sobre as doenças causadas por protozoários nessas aves. O presente estudo teve como objetivo conhecer aspectos epidemiológicos da infecção por coccídios da família Sarcocystidae em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), através de análises moleculares e sorológicas. Foram realizadas duas campanhas, uma em 2014 e outra em 2015, com a finalidade de obter amostras de sangue e tecidos dos pinguins que vieram a óbito durante reabilitação no Instituto de Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos (IPRAM) localizada em Cariacica, Espírito Santo. Foram colhidas 514 amostras de tecidos (músculo=342, coração=86, cérebro=86) de 310 indivíduos. Dos tecidos de 54 pinguins foi realizado o bioensaio em camundongos para o isolamento de *T. gondii*, mas nenhum isolado foi obtido. Amostras de 310 indivíduos tiveram o DNA extraído para a pesquisa de coccídios da família Sarcocystidae utilizando-se os marcadores 18S rDNA, espaçador interno transcrito 1 (ITS1), codificador de proteínas de superfície (SAG)2, SAG3 e SAG4, subunidade beta da RNA polimerase (RPOB) e citocromo B (CytB). Destas, 16 (3.0%) amostras de músculo peitoral foram positivas para o gênero *Sarcocystis* spp., quando analisadas pelo marcador 18S, e todas com resultados idênticos. Com o ITS1, RPOB e CytB foram confirmadas as espécies de *Sarcocystis* em 12 amostras, todas idênticas a *S. falcatula*-like. Com os marcadores SAGs foi possível observar que as sequências não tinham variabilidade genética. Das 145 amostras de soro avaliadas para a presença de anticorpos anti-*T. gondii*, pelo Teste de Aglutinação

Modificado (MAT ≥ 20), 18 aves foram positivas com títulos de: 20 (7 aves), 40 (9 aves) e 80 (2 aves). Este é o primeiro relato de *S. falcatula*-like e de anticorpos anti - *T. gondii* em pinguins-de-magalhães de vida livre.

Palavras Chave: *Sarcocystis*, *Toxoplasma*, Pinguins, Brasil.

ABSTRACT

Acosta, I.C.L. **Research of coccidia of the Sarcocystidae family in magellan penguins (*Spheniscus magellanicus*) stranded in the brazilian coast. [Pesquisa de coccídios da família Sarcocystidae em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encalhados na costa brasileira.]**. 2017. 67 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The genus *Sarcocystis* is composed of several species that are differentiated by the morphological, biological and molecular characteristics. More than 196 species found in mammals, birds and reptiles have been reported, and only 26 of these species have the complete known cycle. *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite with cosmopolitan geographic distribution, capable of infecting a wide variety of mammals and birds, including man, characterizing its zoonotic potential. In recent decades, the number of penguins that have come from Argentine and Chilean Patagonia, the region of birth of these birds, to the Brazilian coast, where many of them are stranded and rescued, has increased significantly. Little is known about the diseases caused by protozoa in these birds. The present study had as objective to study epidemiological aspects of coccidia infection of the family Sarcocystidae in Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*), through molecular and serological analyzes. Two campaigns were carried out, one in 2014 and another in 2015, in order to obtain blood and tissue samples from penguins who died during rehabilitation at the Institute of Research and Rehabilitation of Marine Animals (IPRAM) in the municipality of Cariacica, Espírito Santo. Tissue samples (total = 514: muscle = 342, heart = 86, brain = 86) were collected from 310 birds. From the tissues of 54 penguins the mouse bioassay was performed for the isolation of *T. gondii*, but no isolates were obtained. Samples of 310 individuals had DNA extracted for

coccidia from the Sarcocystidae family using the 18S rDNA, Transcribed internal spacer 1(ITS1), surface protein encoder (SAG)2, SAG3, SAG4, beta subunit of RNA polymerase (RPOB) and citochrome B (CytB) markers. Of these, 16 (3.0%) samples, of pectoral muscle, were positive and all were identical to *Sarcocystis* spp. when analyzed by the 18S marker. With ITS1, RPOB and CytB the *Sarcocystis* species were confirmed in 12 samples, all identical to *S. falcatula*-like. With the SAGs it was possible to observe that the sequences had no genetic variability. Of the 145 serum samples evaluated for the presence of anti-*T. gondii* antibodies by Modified Agglutination Test (MAT ≥ 20), 18 were positive with titers of: 20 (7 birds), 40 (9 birds) and 80 (2 birds). This is the first report of *S. falcatula*-like and the presence of antibodies to *T. gondii* in free-living magellanic penguins.

Keywords: *Sarcocystis*, *Toxoplasma*, Penguins, Brazil.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 FAMÍLIA SARCOCYSTIDAE	7
1.1.2 GÊNERO <i>SARCOCYSTIS</i>	9
1.1.3 GÊNERO <i>TOXOPLASMA</i>	13
1.2 PINGUIM-DE-MAGALHÃES (<i>SPHENISCUS MAGELLANICUS</i>)	16
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	22
3.1 GERAL	22
3.2 ESPECÍFICOS	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS	23
4.2. COLETA DE ÓRGÃOS E SORO	23
4.3. PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	24
4.4 DIGESTÃO PÉPTICA DOS TECIDOS	25
4.5 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS	25
4.6 PREPARO DOS TECIDOS PARA PCR	26
4.7 EXTRAÇÃO DE DNA	26
4.7.1 LISE DOS HOMOGENADOS E EXTRAÇÃO DO DNA	26
4.8 PCR 18S rDNA PARA TRIAGEM DAS AMOSTRAS	27
4.8.1 PCR E NESTED-PCR 18S	27
4.8.2 PCR E N-PCR DA REGIÃO ITS1	28
4.8.3 PCR E N-PCR SAG2, SAG3 E SAG4	28
4.8.4 PCR E N-PCR CYTB	29
4.8.5 PCR E N-PCR RPOB	30
4.8.6 SEQUENCIAMENTO	30
4.8.7 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
<u>OCORRÊNCIA DE COCCÍDIOS DA FAMÍLIA SARCOCYSTIDAE EM PINGUINS-DE-MAGALHÃES (<i>SPHENISCUS MAGELLANICUS</i>) RESGATADOS NO BRASIL</u>	<u>32</u>
5.1 INTRODUÇÃO	32
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	34
5.3 RESULTADOS	38
5.4 DISCUSSÃO	42
5.6 REFERÊNCIAS	47
REFERÊNCIAS GERAIS	54

1. INTRODUÇÃO

No decorrer do texto serão apresentados aspectos sobre a biologia e epidemiologia de coccídios da família Sarcocystidae, destacando-se os gêneros *Sarcocystis* e *Toxoplasma*, assim como aspectos da biologia de pinguins-de-magalhães, temas do presente estudo.

1.1 FAMÍLIA SARCOCYSTIDAE

O filo Apicomplexa é composto por parasitas intracelulares obrigatórios que se caracterizam por possuírem uma estrutura chamada complexo apical que é formada por organelas especiais, responsáveis pela invasão celular desses coccídios nas células hospedeiras (LEVINE, 1970; SOLDATI; DUBREMETZ; LEBRUN, 2001; TOMLEY et al., 2001). Dentro deste grupo destaca-se a família Sarcocystidae, que compreende mais de 196 espécies de coccídios que formam cistos teciduais em hospedeiros intermediários. Essa família pode ser dividida em três subfamílias: Sarcocystinae, representada pelo gênero *Sarcocystis* e *Frankelia*; Cystoisosporinae, contendo o gênero *Cystoisospora* e Toxoplasmatinae, uma subfamília com poucas espécies agrupadas nos gêneros *Toxoplasma*, *Neospora*, *Hammondia* e *Besnoitia* (MUGRIDGE et al., 1999; TENTER et al., 2002; MORRISON et al., 2004; SAMARASINGHE; JOHNSON; RYAN, 2008).

Coccídios do gênero *Sarcocystis* apresentam ciclo heteroxeno obrigatório e geralmente têm como hospedeiro definitivo um vertebrado carnívoro, no qual o parasita desenvolve uma fase sexuada intestinal, que culmina na produção de oocistos contendo no seu interior dois esporocistos similares, com quatro esporozoítas cada um. Nos hospedeiros intermediários, a infecção por *Sarcocystis* spp. leva à formação de cistos teciduais contendo bradizoítas (DUBEY et al., 2015a).

Protozoários da subfamília Toxoplasmatinae se desenvolvem assexuadamente nos tecidos dos hospedeiros intermediários (mamíferos e aves) por multiplicação rápida (taquizoítas) e multiplicação lenta (bradizoítas). Os bradizoítas

estão presentes no interior de cistos teciduais e quando ingeridos por um hospedeiro definitivo (canídeo ou felídeo), inicia-se uma proliferação sexuada em células epiteliais intestinais, culminando na formação de oocistos que são excretados nas fezes. Os hospedeiros definitivos são os únicos capazes de eliminar oocistos no ambiente (DUBEY, 1993; McALLISTER et al., 1998; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Com o advento das técnicas moleculares e aplicações em questões taxonômicas, tornou-se possível a confirmação de evidências lançadas pelos achados fenotípicos, assim, quando alguns gêneros e espécies foram avaliados por meio dessas ferramentas, como o sequenciamento de genes, confirmaram-se evidências prévias de que tais coccídios possuíam características afins, sendo então inseridos na família Sarcocystidae, coccídios formadores de cistos (VOTÝPKA et al., 1998; CARRENO; BARTA, 1999; DOLEZEL et al., 1999; SLAPETA et al., 2002; TENTER et al., 2002; SMITH; FRENKEL, 2003; MODRÝ; VOTÝPKA; SVOBODOVÁ, 2004).

Desse modo, segundo a classificação mais utilizada (HEYDORN, 1975; LEVINE, 1977; FRENKEL et al., 1979; LEVINE, 1988; ODENING, 1988; DUBEY et al., 1989; UPTON, 2001; MORRISON et al., 2004; BARTA et al., 2005), os sarcocistídeos têm a seguinte classificação taxonômica:

Reino: Protista
 Sub-reino: Protozoa
 Filo: Apicomplexa
 Classe: Sporozoasida
 Subclasse: Coccidiasina
 Ordem: Eucoccidiorida
 Subordem: Eimeriorina
 Família: Sarcocystidae
 Subfamília: Sarcocystinae
 Gênero: *Sarcocystis*

Subfamília: Cystoisosporinae
 Gênero: *Cystoisospora*

Subfamília: Toxoplasmatinae

Gênero: *Toxoplasma*

Gênero: *Neospora*

Gênero: *Hammondia*

Gênero: *Besnoitia*

1.1.2 GÊNERO *Sarcocystis*

O gênero *Sarcocystis* é constituído por várias espécies que se diferenciam pelas características morfológicas, biológicas (especialmente a especificidade de hospedeiros intermediários) e moleculares. São encontrados em musculatura e sistema nervoso central de animais homeotérmicos e pecilotérmicos. Foram relatadas mais de 196 espécies, encontradas em mamíferos, aves e répteis e somente 26 dessas espécies possuem o ciclo completo conhecido (DUBEY et al., 2015a).

Os mamíferos são hospedeiros intermediários de 148 espécies e hospedeiros definitivos de 56 espécies; as aves são hospedeiros intermediários de 20 espécies e hospedeiros definitivos de 12; os répteis são hospedeiros intermediários de 16 espécies e hospedeiros definitivos de 22 e há um relato de peixe (*Salvelinus fontinalis*) como hospedeiro intermediário (*Sarcocystis salvelini*). Em relação às aves, atualmente são conhecidas 30 espécies de *Sarcocystis* que formam sarcocistos em tecidos musculares, de pelo menos, 13 ordens nesse grupo de hospedeiros, principalmente em Psittaciformes, Passeriformes, Columbiformes, Suliformes e Strigiformes (KUTKIENÉ et al., 2012; DUBEY et al., 2015a).

Sarcocystis spp. tem ciclo heteróximo obrigatório e apresenta como hospedeiro definitivo um vertebrado carnívoro que se infecta ingerindo cistos teciduais presentes, particularmente, nos tecidos musculares de hospedeiros intermediários vertebrados herbívoros, onívoros, roedores e aves. Os hospedeiros intermediários adquirem o parasita ao ingerirem esporocistos eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos (ODENING, 1998, DUBEY et al., 2015a).

Sarcocystis neurona e *Sarcocystis falcatula* são espécies muito similares que possuem como hospedeiros definitivos os marsupiais do gênero *Didelphis*. Esses mamíferos também participam como hospedeiros definitivos de outras espécies como *Sarcocystis speeri* (DUBEY et al., 1989; DUBEY; LINDSAY, 1999) e *Sarcocystis lindsayi* que também possuem características morfológicas similares (DUBEY et al., 2001). A estreita relação entre *S. neurona* com *S. falcatula* tem sido demonstrada por análise de sequência do gene do RNA ribossomal 18S (DAME et al., 1995; FENGER et al., 1995). Contudo, apesar das semelhanças, podem ser diferenciados biologicamente, *S. falcatula* não infectando camundongos mas sim aves e *S. neurona* não infectando aves e sim camundongos (DUBEY; LINDSAY, 1998; OLIAS et al., 2014; VALADAS et al., 2016).

Sarcocystis neurona é o parasita mais frequentemente associado à Mieloencefalite Protozoária Equina (EPM), o qual foi isolado e descrito, pela primeira vez, em tecidos neurais de equinos por Dubey et al. (1991). Os hospedeiros intermediários conhecidos de *S. neurona* são os felinos domésticos (*Felis catus*), tatu-galinha (*Dasypus mephitis*), lontra-marinha (*Enhydra lutris*), além dos equinos domésticos (*Equus caballus*) (CHEADLE et al., 2001a,b; DUBEY et al., 2001b; MULLANEY et al., 2005). No Brasil, *S. neurona* foi isolado pela primeira vez do intestino de dois gambás da espécie *D. albiventris* do estado de São Paulo em 2001 (DUBEY et al., 2001b). Recentemente, foi sugerido que os lincês (*Lynx rufus*) são hospedeiros intermediário de *S. neurona* (VERMA et al., 2015).

Equinos eram considerados hospedeiros aberrantes de *S. neurona*, porque sarcocistos deste agente não se desenvolveriam completamente em seus tecidos. Entretanto, em uma única ocasião esquizontes maduros foram encontrados em sistema nervoso e musculatura esquelética de um equino com sinais clínicos de EPM. A identificação do parasito foi realizada por métodos moleculares, imunológicos e por análise morfológica, sugerindo que, ocasionalmente, o cavalo pode ser hospedeiro intermediário de *S. neurona* (MULLANEY et al., 2005).

Aves de diversos grupos taxonômicos são hospedeiros intermediários de *S. falcatula* (BOX; MEIER; SMITH, 1984), que pode causar doença em uma ampla diversidade de aves, entre passeriformes, columbiformes e psitacíformes, não sendo raros os relatos de surtos de sarcocistose pulmonar aguda em psitacídeos de cativeiro (JACOBSON et al., 1984; SMITH et al., 1990; HILLYER et al., 1991; CLUBB, FRENKEL, 1992; PAGE et al., 1992; DUBEY et al., 2001a), mas é

raramente relatada como causa de encefalite em aves selvagens (WUNSCHMANN et al., 2010).

As primeiras descrições de *S. falcatula* foram no século XIX e seu ciclo de vida foi descrito mais tarde (BOX, SMITH, 1982; BOX, et al., 1984). O primeiro relato no Brasil da ocorrência de *S. falcatula* foi em 2000, pela análise de oocistos excretados por gambás da espécie *D. albiventris*, em Jaboticabal, São Paulo (DUBEY et al., 2000a). Assim como em outras sarcocistoses, os esporocistos deste agente estão disponíveis no ambiente como contaminantes de alimentos ou água e são ingeridos pelas aves. Hospedeiros paratênicos, insetos principalmente, também podem transmitir o agente para animais suscetíveis (CLUBB, FRENKEL, 1992). Sua patogenicidade depende do hospedeiro. Aves de continentes não americanos tendem a sofrer infecções graves com elevada mortalidade, em contraste com aves originárias das Américas. Tal diferença explica-se por interpretações de natureza evolutiva, pois aves dos continentes americanos são simpátricas aos hospedeiros definitivos de *S. falcatula* e evoluíram na presença deste agente, o que deve tê-las tornado adaptadas à infecção (BOX, SMITH, 1982; HILLYER et al, 1991; PAGE et al, 1992).

Sarcocystis calchasi foi descrito, como um parasita emergente, causando uma nova síndrome, que pode induzir uma encefalite fatal em pombos domésticos (*Columba livia* f. *domestica*) na Alemanha (OLIAS et al., 2010), em psitacídeos de cativeiro e em pombos domésticos nos Estados Unidos (RIMOLDI et al., 2013; OLIAS et al., 2014) e como hospedeiro final em açor (*Accipiter gentilis gentilis*) encontrados naturalmente infectados na Europa (OLIAS et al., 2011).

Sarcocystis lindsayi foi descrito por Dubey, Rosenthal e Speer (2001) em *D. albiventris* no Brasil, se diferenciando de *S. falcatula* pelas suas características estruturais e genéticas, tendo como hospedeiro definitivo *D. albiventris* e *D. aurita* (DUBEY et al., 2001; STABENOW et al., 2012). Os hospedeiros intermediários naturais ainda são desconhecidos, contudo, periquitos (*Melopsittacus undulates*) foram experimentalmente infectados e sugeriu-se que poderiam ser hospedeiros intermediários (LINDSAY et al., 2001).

Sarcocystis felis foi descrito em 1992 por Dubey e colaboradores em lince americano (*Lynx rufus*) e já foi relatado em outros felídeos silvestres como *Panthera leo* (leão), *Acinonyx jubatus* (guepardo ou chita) e em gato doméstico, contudo possui ciclo desconhecido (DUBEY et al., 2015a). Recentemente, no Rio Grande do

Sul, Brasil, um estudo utilizando métodos moleculares, forneceu evidências de que pequenos felinos selvagens neotropicais (*Puma yagouaroundi*, *Leopardus geoffroyi*, *Leopardus guttulus*, *Leopardus wiedii*, *Leopardus colocolo*) sejam hospedeiros intermediários naturais de *S. felis* (CAÑÓN- FRANCO et al., 2016).

Sarcocystis speeri foi descrito em 1999 em *Didelphis virginiana* (gambá da América do Norte) sendo também seu hospedeiro definitivo (DUBEY; LINDSAY, 1998). No Brasil o primeiro relato de *S. superei* ocorreu em 2000, em *Didelphis marsupialis*, de forma experimental e esta espécie é também considerada hospedeiro definitivo (DUBEY et al., 2000b). Esporocistos de *S. neurona*, *S. falcatula* e *S. speeri* são similares morfológicamente, mas podem ser distinguidos por sua patogenicidade e infectividade em aves e camundongos imunodeficientes. *S. falcatula* não é infectante para camundongos imunodeficientes, enquanto *S. neurona* e *S. speeri* não infectam aves, mas infectam mamíferos. Contudo, *S. calchasi*, *S. falcatula* e *S. lindsayi* infectam aves (DUBEY; LINDSAY, 1998; DUBEY; SPEER; LINDSAY, 1998; OLIAS et al., 2014). Ambos, *S. neurona* e *S. speeri*, podem induzir encefalites em camundongos associadas a presença de esquizontes e merozoítos (DUBEY; LINDSAY, 1998).

No Brasil esporocistos de *Sarcocystis* spp., eliminados por gambás do gênero *Didelphis*, foram diferentes de *S. neurona* e *S. falcatula*, em sequências de espaçador interno transcrito 1 (ITS1), um segmento de DNA nuclear que faz parte do locus ribossômico, entre as frações codificadoras das unidades ribossômicas 18S e 5.8S (VALADAS et al., 2016). Uma extensa variabilidade em genes codificadores de proteínas de superfície (SAG) foi encontrada em esporocistos de *Sarcocystis* spp. detectados em fezes de gambas do gênero *Didelphis* no Brasil (MONTEIRO et al., 2013; VALADAS et al., 2016). Nas amostras analisadas, um elevado número de alelos foi encontrado para cada SAG, sendo 10 variantes para SAG2, 15 para SAG3 e 11 para SAG4. No geral, dentre as 50 amostras brasileiras de esporocistos examinadas, nenhuma apresentou SAG2, SAG3 ou SAG4 idênticos aos seus respectivos homólogos de *S. neurona* e *S. falcatula*.

O primeiro relato do parasito sarcocistídeo em Maçarico preto ou Tapicuru de cara pelada (*Phimosus infuscatus*), uma ave Pelecaniforme da família Threskiornithidae, da fauna silvestre brasileira, teve ITS1, Citocromo B (CityB) e o marcador da subunidade beta da RNA polimerase (RPOB) caracterizado, revelando uma combinação inédita, um parasito que produziu lesões

histopatológicas e sinais clínicos de natureza neurológica (KONRADT et al., 2017). Os alelos encontrados já haviam sido descritos anteriormente no Brasil em amostras de esporocistos de *Didelphis* spp. (MONTEIRO et al., 2013; VALADAS et al., 2016).

O gene CytB tem se mostrado um marcador molecular de grande valor para as filogenias moleculares pois o mesmo não é afetado por múltiplas substituições de nucleotídeos fixadas por pressões seletivas, já que muitas das substituições encontradas nestes *loci* são sinônimas (MEYER, 1994; AVISE; WALKER; JOHNS, 1998). Além disso, pelo fato de ser um gene codificador de uma proteína universal, permite que alinhamentos de sequências homólogas possam ser realizados com confiabilidade maior que os alinhamentos de sequências de genes codificadores de RNA ribossômicos ou sequências não codificadoras sendo principalmente usados devido essas características (RUSSO, 2001).

Foi demonstrado que, assim como a mitocôndria, o apicoplasto possui herança maternal (FERGUSON et al., 2005), e que apresentam DNA conservado, o que o torna uma importante ferramenta para escrever histórias evolutivas (FEAGIN, 1994; KOHLER et al., 1997).

Dubey et al. (2003) utilizou um gene codificado pelo plastídio do genoma de apicoplasto, denominado RPOB para diferenciação de sarcocistos teciduais encontrados em lontras-marinhas (*Enhydra lutris*). Com o uso de sequências homólogas de *S. neurona*, *S. falcatula* e *S. lindsayi* foi possível gerar uma árvore filogenética onde foram formados dois clados, um contendo as sequências de *Sarcocystis* spp. e um contendo sequências de *N. caninum* e *T. gondii*. Dentre as sequências de *Sarcocystis* foi possível observar substituições de nucleotídeos permitindo diferenciação de gênero e espécie (DUBEY et al., 2003).

1.1.3 GÊNERO *Toxoplasma*

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório, com distribuição geográfica cosmopolita, capaz de infectar uma ampla variedade de mamíferos e aves, inclusive o homem, caracterizando seu potencial zoonótico. Contudo, o parasita produz uma infecção assintomática na maioria de seus hospedeiros, devido

à rápida indução da resposta imune celular, o que resulta no controle da multiplicação dos taquizoítas e estabelecimento de uma infecção crônica (YAP; SHER, 1998).

O parasita foi descrito pela primeira vez em 1908 por Splendore em São Paulo, em coelhos de laboratório e por Nicole e Manceaux, no mesmo ano, na Tunísia, no cérebro de um roedor selvagem (*Ctenodactylus gundii*) de origem africana (SPLENDORE, 1908; NICOLE; MANCEAUX, 1908).

Estima-se que até um terço da população humana tenha sido exposta a *T. gondii* (JACKSON; HUTCHINSON, 1989; ASHBURN, 1992; DUBEY, 1998a) e no Brasil, a prevalência da infecção em humanos é especialmente alta, alcançando até 100% em algumas áreas (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; SOBRAL et al., 2005; DE MOURA et al., 2006; DUBEY et al., 2012).

Nos animais, o interesse na avaliação da ocorrência de toxoplasmose é maior em torno das espécies que coabitam com o homem ou que lhe servem de fonte de alimento, porque de uma maneira ou de outra, estes animais podem desempenhar o papel de reservatórios das infecções humanas (SOGORB et al., 1972). A patogenicidade do *T. gondii* para as diversas espécies é bastante variável (DUBEY et al., 1985; CANFIELD et al., 1990; CUNNINGHAM et al., 1992; DUBEY et al., 1995).

Embora pesquisas indiquem que os animais selvagens são frequentemente positivos nos testes sorológicos a anticorpos anti-*T. gondii* (DUBEY; BEATTIE, 1988; DRESSEN, 1990; VITALIANO et al., 2004; SOLORIO et al., 2010; MINERVINO et al., 2010; ANDRÉ et al., 2010; MOLINA-LOPEZ et al., 2011; FORNAZARI et al., 2011; FOURNIER et al., 2014), o papel da vida selvagem na transmissão desse agente ainda é pouco conhecido (HUMPHREYS et al., 1995).

Estudos da ocorrência sorológica de anticorpos anti-*T. gondii* em aves silvestres no Brasil já foram realizados em: avestruz (HOVE; MUKARATIRWA, 2005; CONTENTE et al., 2009; ALMEIDA et al., 2013), ema (MAROBIN et al., 2004; SOARES et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013), urubus (GENNARI et al., 2017), aves da família Cracidae (LEITE et al., 2007), em Passeriformes (GENNARI et al., 2013), Pelecaniformes, Phaethontiformes (GENNARI et al., 2016b), Passeriformes e Columbiformes (ANDRADE et al., 2016), com valores de ocorrência de 13,2% a 93,3%.

A caracterização genotípica de diferentes isolados de *T. gondii*, através de

métodos moleculares, tem sido realizada em sua maioria com amostras de humanos e animais domésticos e, em menor frequência, com tecidos de animais selvagens (KHAN et al., 2006; PENA et al., 2008; YAI et al., 2009; PENA et al., 2011; DA SILVA et al., 2011; CABRAL et al., 2013; CAÑÓN-FRANCO et al., 2013; VITALIANO et al., 2014; RICHINI-PEREIRA et al., 2016; DE ALMEIDA et al., 2017). Entretanto, esforços recentes para genotipar isolados de *T. gondii* provenientes de vida selvagem mostram que os chamados genótipos “exóticos” ou “atípicos” não são anomalias insignificantes na estrutura populacional deste parasito e sim membros importantes do “pool” de genes que proporcionam uma melhor representação da vasta gama de hospedeiros utilizada por este parasita (WENDTE et al., 2011).

No Brasil, a estrutura populacional de *T. gondii* tem se apresentado diferente do padrão clonal observado, em especial na Europa e América do Norte (SHWAB et al., 2014). A genotipagem multilocus por PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição) tem revelado uma grande diversidade de populações de *T. gondii*, demonstrando genótipos típicos da América do Sul e em especial do Brasil (DUBEY et al., 2007; PENA et al., 2008; DA SILVA et al., 2011; KHAN et al., 2011; PENA et al., 2011; PENA et al., 2013; SHWAB et al., 2014; BERTRANPETIT et al., 2017).

Em 2008, Pena e colaboradores, após analisarem isolados de animais domésticos do Brasil, subdividiram as linhagens em quatro tipos, baseados em características biológicas, moleculares e de ocorrência, e as denominaram BrI, BrII, BrIII e BrIV. A linhagem BrI foi classificada como altamente virulenta para camundongos com 100% de mortalidade em bioensaio. A linhagem BrII apresentou virulência intermediária em camundongos e a cepa tipo BrIII foi considerada não virulenta. Já a linhagem BrIV, por apresentar uma mortalidade variada em camundongos, foi interpretada como intermediária.

Poucos dados estão disponíveis na literatura sobre o perfil genético de *T. gondii* circulante em vida selvagem no Brasil e na América do Sul. Yai et al. (2009) realizaram a genotipagem de 36 isolados de capivaras provenientes de seis municípios de estado de São Paulo. Foram identificados 16 genótipos utilizando 11 marcadores genéticos de RFLP. Não foram encontrados isolados pertencentes às linhagens clonais clássicas tipo I e tipo II, porém oito dos 36 isolados puderam ser classificados dentro das linhagens clonais comuns do Brasil: BrI, BrII e BrIII. Sete dos 16 genótipos foram descritos pela primeira vez e três dos 36 isolados

apresentaram infecções mistas. Assim como em estudos anteriores, os isolados tipo BrI apresentaram alta virulência, os isolados tipo BrII com virulência intermediária e os isolados tipo BrIII não foram virulentos para os camundongos infectados, seguindo a classificação proposta por Pena et al. (2008).

No Brasil *Toxoplasma gondii* foi isolado e caracterizado geneticamente em macaco bugio (*Alouatta belzebul*) e gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*), provenientes do zoológico de Recife e de um gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*), capturado na cidade de São Paulo. Apenas o isolado do bugio não foi virulento para camundongos, nenhum dos isolados pertencia às linhagens arquétipo e dois deles (gato-mourisco e gambá) ainda não haviam sido descritos (PENA et al., 2011). Em outro estudo com mamíferos e aves de vida livre, foram obtidos 13 isolados de diferentes regiões e ecossistemas do Brasil, encontrando isolados “atípicos” e dos tipos BrI e BrIII, demonstrando o mesmo perfil observado com as espécies doméstica e com o homem (VITALIANO et al., 2014)

Em relação às aves silvestres, dois trabalhos brasileiros relatam a obtenção de isolados de *T. gondii* sendo obtidos em pombo silvestre (*Zenaida auriculata*), da cidade de Londrina, Paraná, no qual foi encontrado o tipo clonal II, sendo esta linhagem pouco encontrada no Brasil, porém muito comum na América do Norte e já descrita em galinhas do Chile (DUBEY et al., 2011; RAJENDRAN et al., 2012). Em outro estudo, isolou-se de um pica-pau (*Dryocopus lineatus*) da cidade de São Paulo, que demonstrou ser muito virulento e letal para os camundongos (BARROS et al., 2014; VITALIANO et al., 2014), indicando que também em aves silvestres há uma variabilidade genética de *T. gondii* circulando no Brasil.

1.2 PINGUIM-DE-MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*)

Os pinguins pertencem à ordem Sphenisciformes e à família Spheniscidae, sendo aves marinhas que vivem em colônias (OLIVEIRA et al., 2011). O pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) é uma ave de porte médio, com aproximadamente 70 centímetros de comprimento e 5 a 6 kg de peso (FIGURA 1). Os olhos, bico e patas são da coloração preta, com plumagem negra nas costas e nas asas e branca na zona ventral e no pescoço. A maior parte dos exemplares tem

na cabeça uma risca branca, que passa por cima das sobrancelhas, contorna as orelhas e se une no pescoço, e uma risca negra e fina na barriga em forma de ferradura (MADER et al., 2011).

Figura 1- Pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) em reabilitação no Instituto de Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos (IPRAM), no município de Cariacica, Espírito Santo, Brasil, 2015.

Fonte: Igor C.L. Acosta, 2015.

O rastreamento por satélite durante a migração dessas aves mostrou que geralmente elas seguem uma rota bem definida, como uma rodovia com menos de 100 km de largura, deslocando-se nela tanto para o norte quanto para o sul (STOKES et al., 1998; MADER et al., 2011).

Os pinguins-de-magalhães habitam no Atlântico e Pacífico, em áreas de águas temperadas e sua população mundial é estimada em 1.300.000 pares de

reprodutores. Apesar disso, o número de aves nas duas maiores colônias da Argentina e do Chile vêm passando por acentuada diminuição nas últimas décadas (MADER et al., 2010; CALVERT et al., 2013). Reproduzem-se na costa da Argentina, do Chile e das Ilhas Malvinas durante os meses de setembro a março e, antes do inverno, esses pinguins migram acompanhando a corrente das Malvinas (FIGURA 2), em busca de um lugar com maior disponibilidade de alimentos e acabam sendo trazidos para a costa sul e sudeste do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Rio de Janeiro e Espírito Santo) entretanto, esporadicamente, alguns animais chegam até o nordeste brasileiro (OLIVEIRA et al., 2011).

Figura 2- Período do ano e locais de encalhe dos pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) no litoral brasileiro.

Desde 2006, a quantidade de pinguins que chegam ao litoral brasileiro tem aumentado significativamente, sendo a provável causa, um fenômeno oceânico-

atmosférico chamado La Niña, caracterizado por um esfriamento anormal nas águas superficiais do Oceano Pacífico Tropical que influencia as correntes marinhas (MADER et al., 2011). Da Patagônia argentina e chilena, onde encontram-se as colônias, até o litoral brasileiro, onde muitos encalham e são resgatados, os pinguins percorrem mais de 3500 quilômetros (OLIVEIRA et al., 2011).

Pouco se sabe sobre a infecção por *T. gondii* em pinguins, existindo apenas um estudo com pinguins-de-galápagos (*Spheniscus mendiculus*), da Ilha de Galápagos, com detecção de anticorpos anti-*T. gondii* e soroprevalência de 2,3% em 298 animais estudados (DEEM et al., 2010). Em 2016, no Brasil, foi feito o primeiro relato de anticorpos anti-*T. gondii* em 100 pinguins-de-magalhães, entretanto, grande parte dos animais do estudo viviam em cativeiros há vários anos não sendo possível obter informações precisas sobre a natureza da infecção (GENNARI et al., 2016).

Existem alguns casos de toxoplasmose que foram diagnosticados histologicamente em pinguins de cativeiro. Nos EUA, Ratcliffe e Worth (1951) diagnosticaram toxoplasmose em quatro pinguins de Humboldt (*Spheniscus humboldti*), em dois pinguins-de-magalhães (*S. magellanicus*) e em um pinguim-africano (*Spheniscus demersus*). Na Austrália, Mason et al. (1991) relataram toxoplasmose em um pinguim-azul (*Eudyptula minor*) e o diagnóstico foi confirmado por imunohistoquímica. Na Holanda, também foi relatado toxoplasmose em três pinguim-africano (*Spheniscus demersus*) de cativeiro pela mesma técnica diagnóstica (PLOEG et al., 2011).

Em relação a *Sarcocystis* ou outros Sarcocistídeos, não há nada descrito nessa espécie de ave na literatura científica.

O Instituto de Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos (IPRAM), localizado no município de Cariacica, Espírito Santo, é um importante polo de recebimento e reabilitação de pinguins que encalham na costa brasileira. No IPRAM, na chegada das aves, estas recebem todos os cuidados necessários para a estabilização das condições de saúde, pois chegam muito debilitadas, desidratadas, hipotérmicas e algumas delas com lesões graves e fraturas. Depois que as aves são estabilizadas, amostras biológicas (sangue, swabs) podem ser colhidas para o acompanhamento da saúde e posterior soltura das que estiverem aptas para o regresso até suas colônias. De 2001 a 2013, o IPRAM recebeu 1.064 pinguins provenientes dos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia, o número

máximo de encalhe foi em 2008 (3.371 espécimes) e o mínimo em 2006 (26 espécimes) (SILVA et al., 2001; PONTES et al., 2007; GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2010; MAYORGA et al., 2012; 2013).

2 JUSTIFICATIVA

As aves marinhas fazem parte de um grupo de animais diversificado e adaptados ao seu ambiente, além de serem ótimas indicadoras do estado de saúde e de conservação do ecossistema marinho (PIATT, 2007; PETRY, 2012). De acordo com Branco et al. (2010), ao longo da costa brasileira podem ser encontradas cerca de 148 diferentes espécies, pertencentes às cinco ordens de aves marinhas (Sphenisciformes, Procellariiformes, Pelecaniformes, Suliformes e Charadriiformes), que utilizam a costa brasileira em diferentes épocas do ano para alimentação e reprodução. Esse número evidencia a importância da plataforma continental brasileira para a conservação das aves marinhas e costeiras (CBRO, 2011).

Pinguins podem ser considerados sentinelas do ecossistema marinho, uma vez que são muito sensíveis às perturbações causadas em seu habitat. Atualmente a população de pinguins-de-magalhães vem diminuindo de maneira exponencial e acredita-se que as principais ameaças vividas pelos indivíduos da espécie sejam a contaminação dos oceanos por petróleo e seus derivados (GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2006, 2010; RUOPPOLO, 2012), afogamento ou inanição devido a competição com a indústria pesqueira (CARDOSO et al., 2011), alterações climáticas (BOERSMA; REDSTOCK, 2014) e patógenos que essas aves estão expostas podendo levá-las à morte. Assim sendo, esta espécie está classificadas na “Lista Vermelha” da IUCN (International Union for Conservation of Nature) como quase ameaçada. Os pinguins possuem um papel importante na cadeia alimentar de pinípedes, nos quais já há relato de presença de anticorpos anti-*T. gondii* como observado em leões marinhos (*Otaria byronia*) no Chile, local de origem de parte das aves do presente estudo (SEPÚLVEDA et al., 2015).

Em um único estudo realizado no Brasil com pinguins de cativeiro, através de sorologia, um grande número de indivíduos foram positivos para anticorpos anti-*T. gondii*. Entretanto, apesar de praticamente todas as aves não terem nascidas nos

cativeiros, o local de infecção não pode ser determinado devido ao longo tempo de moradia desses animais nos cativeiros (GENNARI et al., 2016). Nada é conhecido, até o momento, sobre *Sarcocystis* em pinguins. No entanto, no Brasil, em 2017, ocorreu a descrição de *S. falcatula* em Maçarico preto ou Tapicuru de cara pelada (*Phimosus infuscatus*), ave marinha nativa do Brasil (KONRADT et al., 2017).

Pouco se sabe sobre a infecção por coccídeos da família Sarcocystidae em pinguim-de-magalhães (*S. magellanicus*). Muitos pinguins encalham vivos ou morrem nas praias brasileiras todos os anos e muitos deles são resgatados por Centros de Reabilitação ao longo da costa. Por ser um animal de caráter migratório e utilizar grandes áreas para sua sobrevivência, estas aves podem desempenhar um papel importante na cadeia epidemiológica desses coccídios.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

3.1.1 Contribuir para o conhecimento epidemiológico de coccídios da família Sarcocystidae em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), espécie que frequenta a costa brasileira.

3.2 ESPECÍFICOS

3.2.1 Caracterizar coccídios da família Sarcocystidae, a partir de amostras de tecidos de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), naturalmente infectados, que venham a óbito após encalhe nas praias do litoral brasileiro.

3.2.2 Realizar sorologia para detectar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), naturalmente infectados, resgatados no litoral brasileiro.

3.2.3 Caracterizar biológica e genotipicamente cepas de *T. gondii* a partir de amostras de tecidos de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*), naturalmente infectados, que venham a óbito após encalhe nas praias do litoral brasileiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item serão apresentadas características do local, período de realização das coletas e descritas as metodologias utilizadas para o desenvolvimento deste estudo.

A captura das aves e as coletas de amostras biológicas foram autorizadas por meio das licenças nº 36250-5 e 26896-3 pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Este procedimento e todas as etapas foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária

e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) sob o nº 9701041113.

4.1. PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS

Todos os pinguins que chegaram ao Instituto de Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos (IPRAM), no município de Cariacica, na Grande Vitória (Espírito Santo), em 2014 de 1 de junho a 30 agosto e em 2015 de 5 de maio a 16 outubro, tiveram amostras coletadas.

Com a ausência do encalhe das aves em 2014, decidiu-se amostrar carcaças congeladas de aves encalhadas e que vieram a óbito em anos anteriores (2012 e 2013). Com este material não foi possível a análise biológica (bioensaio em camundongos), mas foram realizadas análises moleculares.

No ano de 2015 os animais resgatados na costa do estado do Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ) e Bahia (BA) foram encaminhados ao IPRAM. As aves resgatadas no RJ e na BA foram enviadas, por via terrestre, em caixas apropriadas e, desde sua captura até a chegada ao IPRAM, levavam cerca de 24 a 72 horas. No litoral capixaba, do resgate ao início da reabilitação no IPRAM, o tempo foi de, no máximo, 24 horas.

4.2. COLETA DE ÓRGÃOS E SORO

Das aves que foram descongeladas, realizou-se a necropsia colhendo amostras de: cérebro, coração e músculo peitoral. Esses fragmentos eram acondicionados em microtubos de 1,5 mL, individualmente identificados e mantidos congelados (-20°C) até o processamento das amostras. Nem sempre foi possível a obtenção de todos esses tecidos dos pinguins congelados.

Das aves que vieram a óbito no IPRAM em 2015, realizou-se a necropsia colhendo amostras de: cérebro, coração e músculo peitoral. Os órgãos foram acondicionados individualmente em sacos plásticos, identificados e mantidos em geladeira com temperatura de 4°C, por no máximo três dias, até o envio ao laboratório, em São Paulo, para realização do bioensaio em camundongo, na tentativa de isolamento de *T. gondii*. O

material foi enviado pelo correio, em caixas de isopor com gelo. O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). De cada animal necropsiado, foram obtidos: data de entrada no IPRAM, data do óbito, sexo e idade (juvenil ou adulto).

Foram obtidas em 2015 (n=145 espécimes) amostras de soro. Estas foram utilizadas para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, sendo colhidas depois de sete a 10 dias da chegada ao IPRAM ou quando da estabilização da saúde da ave. De algumas aves que sobreviveram, foi colhida uma amostra de sangue antes da soltura das mesmas e, das que vieram a óbito, na necropsia, também foram colhidas alíquotas de tecidos para a pesquisa molecular de agentes da família Sarcocystidae.

4.3. PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii*

A pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* no soro das aves foi feita através do Teste de Aglutinação Modificado (MAT) (DUBEY; DESMONTS, 1987). A diluição do soro foi feita em microplaca de 96 poços, usou-se uma solução salina tamponada com pH 7,2 (NaCl 0,146M; NaH₂PO₄ 0,0026M; Na₂HPO₄ 0,008M), filtrado em membrana de 45µm de porosidade. Foram feitas diluições seriadas 1:5, 1:10 e 1:20.

Foi preparada paralelamente a solução de diluição do antígeno, composta de 2,5 mL de solução salina tamponada pH 8,95 (NaCl 0,12M; H₃BO₃ 0,05M; NaN₃ 0,03M; albumina sérica bovina para uma solução de 0,4%), foi usado 35µL de mercaptoetanol 0,2M e 50 µL de Azul de Evans 0,2%. Em seguida 100µL de antígeno-estoque (taquizoítos inteiros fixados na formalina) foi adicionado. Essa mistura foi homogeneizada e 25µL foram distribuídos imediatamente em cada poço da microplaca. Os soros diluídos foram transferidos para os poços da microplaca e misturados com reagente. A placa foi selada com plástico adesivo para evitar evaporação e incubada por 12 horas em estufa a 37°C.

A formação de um botão com contorno definido na base do poço foi considerado resultado negativo; a ligação do antígeno e anticorpo forma uma malha ou véu na superfície do poço, sendo este o resultado positivo (DESMONTS; REMINGTON, 1980).

Os soros dos pinguins com título maior ou igual a 20 (GENNARI et al., 2016) foram considerados positivos e tiveram suas amostras tituladas em diluição seriadas na base dois até a última diluição positiva. Todas as reações foram feitas com uso de controle positivo e negativo previamente testados.

4.4 DIGESTÃO PÉPTICA DOS TECIDOS

Os tecidos (cérebro, coração e músculo) de todos os animais necropsiados em 2015 (n=52) foram cortados em pequenos pedaços, sendo removidos a gordura e o tecido conjuntivo. Amostras de 30 pinguins tiveram os órgãos processados individualmente e amostras de 22 pinguins tiveram os órgãos processados em "pool", de aproximadamente 50g. Os tecidos foram homogeneizados em solução de NaCl 0,85% (salina), com auxílio de um homogeneizador doméstico. Usando pipeta Pasteur foi separado uma alíquota de 250µL desse homogenado, armazenado em microtubo de 1,5mL e congelado a -20°C até o processamento das amostras para a extração de DNA. O restante do homogenado foi mantido em banho-maria à 37°C e após atingir esta temperatura, foi adicionada pepsina ácida (v/v), permanecendo em banho-maria por 1h (DUBEY et al., 1998b).

Com auxílio de um filtro de gaze estéril o material digerido foi filtrado, homogeneizado e acondicionado em tubos tipo Falcon de 50mL. As amostras foram centrifugadas sob refrigeração por 10 minutos a 2500 g. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se solução salina para ressuspender o sedimento. Esta solução foi neutralizada com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 1,2%. Após esse procedimento a solução foi completada com salina 0,85% até 50mL e novamente esta foi centrifugada por 10 minutos a 2500 g (DUBEY et al., 1998b). O sobrenadante foi novamente descartado, ao sedimento foi adicionada penicilina e estreptomicina (v/v) e, após homogeneizar a solução, o conteúdo foi inoculado em camundongos sendo 1mL por via subcutânea por animal

4.5 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

Para os pinguins que tiveram seus tecidos processados individualmente, para cada

órgão foi montado um grupo de três camundongos identificados individualmente e alojados na mesma caixa. Cada camundongo foi inoculado subcutaneamente com 1,0mL do tecido digerido e, após a inoculação, os animais foram observados diariamente. Para os pinguins que tiveram seus tecidos processados em “pool”, o material também foi inoculado em grupos de três camundongos.

Os camundongos inoculados que vieram a óbito foram examinados para a pesquisa de *T. gondii* no cérebro e nos pulmões. Os animais que sobreviveram até seis semanas pós-inoculação (PI) foram examinados para a presença de anticorpos anti-*T. gondii*, através do MAT, na diluição de 1:25 (DUBEY, 1997). Para isso, a colheita do sangue foi realizada pelo plexo venoso mandibular após os camundongos serem contidos fisicamente.

Os camundongos negativos na sorologia foram submetidos à eutanásia e examinados e examinados para a presença de cistos teciduais de *T. gondii* no cérebro. (DUBEY et al., 2002)

4.6 PREPARO DOS TECIDOS PARA PCR

Os tecidos congelados (cérebro, coração e músculo) foram cortados em pequenos pedaços (100-400mg), sendo removidos a gordura e o tecido conjuntivo, homogeneizados individualmente em solução salina 0,85% com o auxílio de pistilo e gral. O homogenado de cada animal foi dividido em duas alíquotas, uma armazenada e congelada a -20°C e outra separada em microtubos de 1,5mL com 250µL do homogenado para a extração do DNA.

4.7 EXTRAÇÃO DE DNA

4.7.1 Lise dos Homogenados e Extração do DNA

A lise dos homogenados assim como a extração do DNA a partir do lisado, seguiu as instruções do fabricante do kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN,

HILDEN, GERMANY). O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o momento da realização da PCR.

4.8 PCR 18S rDNA PARA TRIAGEM DAS AMOSTRAS

O DNA de protozoários sarcocistídeos nas amostras de tecidos dos pinguins foi detectado por *nested*-PCR utilizando primers desenhados com base nas sequências conservadas de *T. gondii*, *H. hammondi*, *N. caninum* e *S. neurona*, que amplificam um fragmento do gene do DNA ribossômico 18S (18S rDNA) comum aos parasitas. Para a PCR foram usados os primers externos: Tg18s48F, (5'CCATGCATGTCTAAGTATAAGC3') e Tg18s359R, (5'GTTACCCGTCCTGCCCAC3'), com 312 pares de base (pb). Na *nested*-PCR utilizou-se os primers internos: Tg18s58F, (5'CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC3') e Tg18s348R, (5'TGCCACGGTAGTCCAATAC3') para amplificar com 291 pares de base (pb) (SU et al., 2010).

4.8.1 PCR e *nested*-PCR 18S

Foi utilizada a seguinte mistura de reagentes na PCR para uma reação de 18µL: 10,76µL de água ultrapura, 1,8µL de tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 1,4µL da mistura de dNTPs – dATP, dTTP, dCTP, dGTP (2,5mM), 0,1µL de cada primer (25µM), 0,7µL de MgCl₂ (50mM), 0,14µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e 3,0µL da amostra de DNA extraído. Para a *nested*-PCR foram utilizadas as mesmas quantidades da mistura de reagentes com primers a 50µM, utilizando-se 2µL do produto da PCR diluído em água ultra pura (1:2). Como controle negativo, foi utilizada água ultrapura. A PCR foi realizada com 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min, e a *nested*-PCR com 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 55°C por 1 min e 72°C por 1,5 min. As reações foram precedidas por uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 4 min. Todas as reações foram reveladas em gel de agarose 1,5%. A revelação foi feita com Syber Safe® (Eugene, OR, USA) de acordo com as especificações do fabricante e a

visualização das bandas em transiluminador ultravioleta.

4.8.2 PCR e *n*-PCR da região ITS1

Técnica utilizada para amostras positivas na triagem como descrito acima. A amplificação pela PCR foi realizada com os primers externos JS4 (CGA AAT GGG AAG TTT TGT GAA C) e CT2c (CTG CAA TTC ACA TTG CGT TTC GC) dirigidos aos genes 18S e 5,8S rRNA, seguida da *nested*-PCR (*n*-PCR-ITS1) com os primers internos JS4b (AGT CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG) e CT2b (TTG CGC GAG CCA AGA CAT C) que flanqueiam a sequência completa do ITS1 comum para coccídios Sarcocystidae (SOARES et al., 2011).

As condições do ciclo da PCR foram de 94° C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 40 seg a 94°C, 30 seg a 56°C e 30 seg a 72°C (ŠLAPETA et al., 2002). Cada 25 µL da reação contendo 0,15µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) *platinum Taq DNA polymerase*TM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 2,5µL de tampão de reação 10x (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0); 0,75µL de MgCl₂ (50mM); 2,0µL da mistura de dNTPs (2,5mM); 1,25µL de cada primer sensu e anti-sensu (10pM), 12,1µL de água ultrapura e 5µL da amostra de DNA.

Na *n*-PCR-ITS1 usaram-se quantidades iguais da mistura da reação de PCR com a substituição dos primers e 2µL da amostra de DNA. Todas as reações foram reveladas em gel de agarose 2,0%. A revelação foi feita com Syber Safe® (Eugene, OR, USA) de acordo com as especificações do fabricante e a visualização das bandas em transiluminador ultravioleta, com um tamanho de banda esperado de ~500 pb para a subfamília Toxoplasmatinae e entre 600 a 1000 pb para a subfamília Sarcocystinae.

4.8.3 PCR e *n*-PCR SAG2, SAG3 e SAG4

A amplificação pela PCR foi realizada com os primers senso SAG2 (GGT CAG AGC TTT GTG CTG AA) e anti-senso SAG2 (ACA ACA CTG TGA GAG ATG CGA)

seguida pela *nested*-PCR com os mesmos primers com 414 pb, SAG3 senso (CTC GCA GTT GCC TGC CTT G), SAG3 anti-senso (ATC CCA CGG ACC CGT TC) seguida da *nested*-PCR com os mesmos primers com 550 pb e SAG4 senso (CCG AGG TAC AGT TCA AGG CG) e anti-senso (CCG AGG TAC AGT TCA AGG CG) seguida da *nested*-PCR com os mesmos primers com 348 pb (MONTEIRO et al., 2013).

As condições do ciclo da PCR foram de 94° C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 40 seg a 94°C, 30 seg a 52°C e 30 seg a 72°C. Cada 25 µL da reação contendo 0,15µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) *platinum Taq DNA polymerase*TM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 2,5µL de tampão de reação 10x (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0); 0,75µL de MgCl₂ (50mM); 2,0µL da mistura de dNTPs (2,5mM); 1,25µL de cada primer sensu e anti-sensu (10pM), 12,1µL de água ultrapura e 5µL da amostra de DNA (MONTEIRO et al., 2013).

Na *n*-PCR foram usadas quantidades iguais da mistura da reação de PCR com os mesmo primers e 2µL da amostra de DNA. Todas as reações foram reveladas em gel de agarose 2,0%. A revelação foi feita com Syber Safe® (Eugene, OR, USA) de acordo com as especificações do fabricante e a visualização das bandas em transiluminador ultravioleta.

4.8.4 PCR e *n*-PCR CytB

A amplificação pela PCR foi realizada com os primers senso CytBF (TAC TTG ACT ACT GCC TGG TTA TCT G) e anti-senso CytBR (GAT ATC CAT GAG GTT ACT ACA TTT C) seguida da *nested*-PCR com os mesmos primers com 656 pb, (SERCUNDES et al., 2016).

As condições do ciclo da PCR foram de 94° C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 40 seg a 94°C, 30 seg a 52°C e 30 seg a 72°C. Cada 25µL da reação contendo 0,15µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) *platinum Taq DNA polymerase*TM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 2,5µL de tampão de reação 10x (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0); 0,75µL de MgCl₂ (50mM); 2,0 µL da mistura de dNTPs (2,5 mM); 1,25 µL de cada primer sensu e anti-sensu (10pM), 12,1µL de água ultrapura e 5µL da amostra de DNA.

Na *n*-PCR usaram-se quantidades iguais da mistura da reação de PCR com a

substituição dos primers e 2µL da amostra de DNA. Todas as reações foram reveladas em gel de agarose 2,0%. A revelação foi feita com Syber Safe® (Eugene, OR, USA) de acordo com as especificações do fabricante e a visualização das bandas em transiluminador ultravioleta.

4.8.5 PCR e *n*-PCR RPOB

A amplificação pela PCR foi realizada com os primers senso RPOBF (ATT TTT GTG GAT ATG ATT TTG AAG ATG C) e anti-senso RPOBR (TTT CCA TAT CTT CCA CAT AAT TTA TCT C) seguida da *nested*-PCR com os mesmos primers com 511 (pb), (SERCUNDES et al., 2016).

As condições do ciclo da PCR foram de 94° C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 40 seg a 94°C, 30 seg a 52°C e 30 seg a 72°C. Cada 25µL da reação contendo 0,15µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) *platinum Taq DNA polymerase*TM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 2,5µL de tampão de reação 10x (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0); 0,75µL de MgCl₂ (50mM); 2,0µL da mistura de dNTPs (2,5mM); 1,25µL de cada primer sensu e anti-sensu (10pM), 12,1µL de água ultrapura e 5µL da amostra de DNA.

Na *n*-PCR usaram-se quantidades iguais da mistura da reação de PCR com a substituição dos primers e 2µL da amostra de DNA. Todas as reações foram reveladas em gel de agarose 2,0%. A revelação foi feita com Syber Safe® (Eugene, OR, USA) de acordo com as especificações do fabricante e a visualização das bandas em transiluminador ultravioleta.

4.8.6 Sequenciamento

As amostras amplificadas pela *nested*-PCR foram submetidas à análise por sequenciamento sendo realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biologia (IB) da USP. A purificação do produto amplificado foi realizada com uma combinação de duas enzimas: Shrim Alkaline Phosphatase (SAP), que degrada os nucleotídeos não incorporados e a Exonuclease I (EXO), que degrada primers residuais e

demais produtos de fita simples indesejáveis. Para isso, foram misturados 10µL de produto da PCR em 4µL de ExoSap (USB, Cleveland, Ohio, USA) e incubou-se em termociclador por 15 minutos a 37°C e depois por 15 minutos a 80°C. Foram acrescentados 5µM de primers internos (Tg18s58F e Tg18s348R) para 18S rDNA, para região ITS1 (JS4b e CT2b), para SAG2, 3, 4, CytB e RPOB os mesmo primers citados acima, a esse produto. Para a reação de sequenciamento utilizou-se o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (cod. 4337456, Applied Biosystems, CA, USA) e sequenciadas utilizando o ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, CA, USA).

4.8.7 Análise das sequências

Para determinação de identidade de nucleotídeos entre sequências gênicas de 18S, CytB, SAG2, SAG3 e SAG4 e outras sequências homólogas disponíveis no Genbank, foi empregado o programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013). Os cálculos de identidade foram realizados usando a matriz de distância p.

As sequências ITS1 e RPOB de amostras de *S. falcatula*-like de pinguins foram comparadas com sequências disponíveis no Genbank. Para esta comparação, foi empregada reconstrução filogenética pelo método de máxima verossimilhança com base em modelo de substituição de nucleotídeo de Kimura 2 parâmetros e Tamura 3 parâmetros para ITS1 e RPOB, respectivamente. Para a análise de ITS1 foram usadas as sequências de maior similaridade identificadas com a ferramenta de busca BLAST e somente aquelas que não tivessem sítios degenerados. Vinte e cinco sequências gênicas foram escolhidas com base neste critério. Para RPOB, foram empregadas as sequências obtidas pelo BLAST e cujo organismo tenha sido anotado inequivocamente. Neste caso, sequência de *Neospora caninum* foi usada como grupo externo. A história evolutiva, o modelo de substituição de nucleotídeos e o método estatístico de bootstrap para avaliar a consistência dos ramos foram realizados com auxílio do programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ocorrência de coccídios da família *Sarcocystidae* em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) resgatados no Brasil

5.1 INTRODUÇÃO

O filo Apicomplexa é composto por parasitas intracelulares obrigatórios que se caracterizam por possuírem uma estrutura chamada complexo apical que é formada por organelas especiais, responsáveis pela invasão celular nas células hospedeiras (LEVINE, 1970; SOLDATI; DUBREMETZ; LEBRUN, 2001; TOMLEY et al., 2001). Dentro deste grupo, destaca-se a família *Sarcocystidae*, que compreende protozoários que formam cistos teciduais (coccídios) em hospedeiros intermediários. Essa família pode ser dividida em três subfamílias: *Sarcocystinae*, representada pelo gênero *Sarcocystis* e *Frankelia*; *Cystoisosporinae*, contendo o gênero *Cystoisospora* e *Toxoplasmatinae*, uma subfamília com poucas espécies agrupadas nos gêneros *Toxoplasma*, *Neospora*, *Hammondia* e *Besnoitia* (MUGRIDGE et al., 1999; TENTER et al., 2002; MORRISON et al., 2004; SAMARASINGHE; JOHNSON; RYAN, 2008).

Organismos do gênero *Sarcocystis* apresentam ciclo heteroxeno obrigatório e geralmente têm como hospedeiro definitivo um vertebrado com hábitos carnívoros. Nos hospedeiros intermediários, a infecção por *Sarcocystis* spp. leva à formação de cistos teciduais contendo bradizoítas (DUBEY et al., 2015). O gênero *Sarcocystis* é constituído por mais de 196 espécies válidas que se diferenciam pelas características morfológicas, biológicas (especialmente a especificidade de hospedeiros intermediários) e moleculares. Os cistos teciduais são encontrados em musculatura e sistema nervoso central de animais homeotérmicos e pecilotérmicos, sendo encontrados em mamíferos, aves, répteis; somente 26 dessas espécies tem o ciclo completo conhecido (DUBEY et al., 2015).

Dentre as espécies de *Sarcocystis* patogênicas para aves, destaca-se *Sarcocystis falcatula*, devido ao fato de causar uma doença respiratória grave já descrita em psitacídeos de cativeiro e em outras ordens de aves cativas como: Psittaciformes, Passeriformes, Columbiformes, Suliformes e Strigiformes (HILLYER et al., 1991;

SUEDMEYER et al., 2001; WUNSCHMANN et al., 2010), mas raramente é observado em aves de vida livre (WUNSCHMANN et al., 2010; KONRADT et al., 2017).

Aves de continentes não americanos tendem a sofrer infecções graves por *S. falcatula*, com elevada mortalidade, em contraste com aves de origem do continente americano. Tal diferença explica-se por interpretações de natureza evolutiva, pois aves dos continentes americanos são simpátricas aos hospedeiros definitivos de *S. falcatula* e evoluíram na presença deste agente, o que deve tê-las tornado adaptadas à infecção (BOX, SMITH, 1982; HILLYER et al, 1991; PAGE et al, 1992).

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório, se desenvolve assexuadamente nos tecidos dos hospedeiros intermediários (mamíferos e aves) infectando inclusive o homem, caracterizando seu potencial zoonótico. Os hospedeiros definitivos, mamíferos do grupo dos felídeos, são os únicos capazes de eliminar oocistos no ambiente através das fezes (DUBEY, 2010). Estudos de ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em aves silvestres no Brasil já foram realizados em animais de diversas ordens (MAROBIN et al., 2004; HOVE; MUKARATIRWA, 2005; LEITE et al., 2007; CONTENTE et al., 2009; SOARES et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013; GENNARI et al., 2013; GENNARI et al., 20016; ANDRADE et al., 2016; GENNARI et al., 2017) com valores de ocorrência de 13,2% a 93,3%.

Pouco se sabe sobre *T. gondii* circulante em aves de vida selvagem. A caracterização através de métodos moleculares tem sido realizada, em sua maioria, com amostras de humanos e de animais domésticos, inclusive aves (galinhas, patos, galinha d'Ángola) e, em menor frequência, em aves de vida livre (KHAN et al., 2006; PENA et al., 2008; YAI et al., 2009; PENA et al., 2011; DA SILVA et al., 2011; CABRAL et al., 2013; CAÑÓN-FRANCO et al., 2013; VITALIANO et al., 2014; RICHINI-PEREIRA et al., 2016; DE ALMEIDA et al., 2017).

Os pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) se reproduzem em áreas dos oceanos Atlântico e Pacífico da América do Sul, na Argentina, Chile e Ilhas Malvinas. O ciclo anual destas aves está intimamente ligado à sua característica sazonal. Machos retornam as colônias reprodutivas em setembro, iniciando a ocupação de ninhos. Fêmeas, um pouco mais tardias, chegam às colônias pouco antes da postura de ovos. Após a incubação (cerca de 40 dias), levam aproximadamente 70 dias para emancipar o filhote. Passado o período reprodutivo, os animais realizam a muda anual de penas, encerrando seu período em terra (WILLIAMS, 1995; GARCÍA-BORBOROGLU; BOERSMA, 2013). Fora da época de reprodução, estas aves migram para o Peru e o

Brasil entre os meses de maio a setembro (SICK, 2001; GARCÍA-BORBOROGLU; BOERSMA, 2013). Essa espécie migratória de pinguim, não forma colônias reprodutivas no litoral brasileiro, mas frequenta esse território durante sua migração invernal em busca de alimentos e, frequentemente, é encontrada encalhada nas praias brasileiras. A grande maioria das aves que encalham são juvenis e susceptíveis aos desafios ambientais e antropogênicos que a primeira migração acarreta. Os pinguins encalhados são resgatados e enviados para Centros de Reabilitação e são reintroduzidos no ambiente natural. Dependendo do seu estado de saúde, são mantidos em cativeiro até estarem prontos para a reintrodução ou, se considerados inaptos à vida livre, são mantidos em cativeiro (MADER et al., 2011; MILLER et al., 2012).

Poucos relatos sobre coccídios da família Sarcocystidae em pinguins estão disponíveis na literatura científica, sendo em sua maioria descrições de inquéritos sorológicos, ou de achados patológicos e clínicos (RATCLIFFE et al., 1951; MASON et al., 1991; PLOEG et al., 2011; DEEM et al., 2010; GENNARI et al., 2016b). O objetivo do presente estudo foi detectar a infecção por coccídios da família Sarcocystidae em pinguins-de-magalhães resgatados na costa brasileira por meio de métodos moleculares e sorológicos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 ÉTICA

A captura e a coleta de amostras biológicas das aves foram autorizadas por meio das licenças nº 36250-5 e 26896-3 pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) sob o nº 9701041113.

5.2.2 PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS

Foram realizadas duas campanhas de colheita de material biológico dos pinguins, entre os meses de maio a novembro de 2014 e 2015, período de encalhe das aves na costa brasileira, ambas no Instituto de Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos (IPRAM), em Cariacica, Espírito Santo, Brasil. Todos os animais encalhados eram jovens (< 4 anos). Com a ausência do encalhe das aves em 2014, decidiu-se obter amostras de aves encalhadas que haviam morrido em anos anteriores (2012 e 2013) e cujas carcaças encontravam-se congeladas. Com este material não foi possível realizar o bioensaio em camundongos para isolamento de *T. gondii*, sendo realizadas somente análises moleculares. No ano de 2015 os animais resgatados na costa dos estados do Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ) e Bahia (BA) foram encaminhados ao IPRAM e foi possível a colheita de sangue de todas as aves encaminhadas e material biológico das que vieram a óbito durante a reabilitação.

5.2.3 COLETA DE AMOSTRAS

Das carcaças que estavam congeladas de anos anteriores colheu-se: músculo peitoral, coração e cérebro.

Das aves que vieram a óbito no IPRAM em 2015, realizou-se a necropsia e obtiveram-se amostras de cérebro, coração e músculo peitoral. As amostras de sangue foram colhidas da veia jugular ou femoral para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, depois de sete a 10 dias da chegada ao IPRAM ou até a estabilização da saúde da ave. De algumas aves que sobreviveram, foi colhida uma amostra de sangue antes da soltura das mesmas e, das que vieram a óbito, na necropsia. O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ-USP.

5.2.4 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*T. gondii*

Anticorpos anti- *T. gondii* foram detectados pelo Teste de Aglutinação Modificado (MAT) segundo DUBEY; DESMONTS (1987). O ponto de corte utilizado foi de 1:20 (GENNARI et al., 2016).

5.2.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

As amostras dos tecidos tiveram o DNA total extraído e purificado por meio de kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguindo recomendações do fabricante, exceto pela eluição do produto final que foi feita em um volume de 50µl do tampão de eluição (tampão AE).

As amostras de DNA foram submetidas à amplificação e sequenciamento de PCR com primers direcionados a sequência codificadora da menor unidade ribossômica (18S) para identificação molecular de organismos da família Sarcocystidae (SU et al., 2010).

As amostras cujas sequências 18S foram identificadas como gênero *Sarcocystis* foram submetidas à amplificação e sequenciamento de PCR com primers direcionados a 18S e à sequência codificadora da unidade ribossômica 5.8S e que flanqueiam o espaçador interno transcrito 1 (ITS1) (SLAPETA et al., 2002; SOARES et al., 2011).

As amostras cujas sequências ITS1 foram identificadas como *S. falcatula*-like foram submetidas à amplificação e sequenciamento de PCR com primers direcionados a SAG2, SAG3 e SAG4 (SAG - *surface antigen gene*) para diferenciação multilocus entre organismos *S. falcatula*-like (MONTEIRO et al., 2013; VALADAS et al., 2016).

Para finalizar foram utilizados nas mesmas amostras os marcadores: citocromo B (CytB), um marcador mitocondrial direcionado a gene de genoma de organelas (MONTEIRO et al., 2013) e o marcador de subunidade beta da RNA polimerase (RPOB), direcionado ao gene de apicoplasto para confirmar a igualdade das sequências geradas com regiões iguais ao grupo taxonômico pesquisado e identidade com o *S. falcatula* (SERCUNDES et al., 2016).

Os primers empregados neste procedimento estão descritos na Tabela 1. Os produtos de PCR foram resolvidos em eletroforese em gel de agarose e revelados com Syber Safe® (Eugene, OR, USA) sob transiluminação com luz ultravioleta, de acordo com as especificações do fabricante.

Os produtos de PCR submetidos a sequenciamento de ácidos nucleicos foram previamente purificados utilizando-se ExoSap-IT® (USB, Cleveland, Ohio, USA) seguindo

as especificações do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados bidirecionalmente utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (cod. 4337456 Applied Biosystems, CA, USA) e o sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, CA, USA).

Tabela 1. Primers para primeira e segunda amplificação de *locus* codificador de 18S, ITS1, SAG-2, SAG-3, SAG-4, Citocromo B e RPOB.

PRIMERS	LOCUS	AMPLIFICAÇÃO *	SEQUÊNCIAS	PRODUTO**	T°C ***
18S					
Tg18s48F	18S	Primeira	CCA TGC ATG TCT AAG TAT AAG C	312	55°
Tg18s359R		Primeira	GTT ACC CGT CAC TGC CAC		
Tg18s58F		Segunda	CTA AGT ATA AGC TTT TAT ACG GC	291	55°
Tg18s348R		Segunda	TGC CAC GGT AGT CCA ATA C		
ITS1					
JS4F	ITS1	Primeira	CGA AAT GGG AAG TTT TGT GAA C	505	56°
CT2cR		Primeira	CTG CAA TTC ACA TTG CGT TTC GC		
JS4bF		Segunda	AGT CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG	367	56°
CT2bR		Segunda	TTG CGC GAG CCA AGA CAT C		
SAG-2					
SAG2-F1	Proteínas de superfície SAG2	Primeira e Segunda	CAA CAA TTG CGT GCA CAC AA	414	52°
SAG2-R1		Primeira e Segunda	ACA ACA CTG TGA GAG ATG CGA		
SAG-3					
SAG3-F1	Proteínas de superfície SAG3	Primeira e Segunda	CTC GCA GTT GCC TGC CTT G	550	52°
SAG3-R1		Primeira e Segunda	CGT TAC CTC GCT TCC ACC A		
SAG-4					
SAG4-F2	Proteínas de superfície SAG4	Primeira e Segunda	CCG AGG TAC AGT TCA AGG CG	348	52°
SAG4-R		Primeira e Segunda	CGA CGA CGA TAC CCA ATG CC		
Citocromo B					
CytBF	Gene Mitochondrial	Primeira e Segunda	TAC TTG ACT ACT GCC TGG TTA TCT G	656	52°
CytBR		Primeira e Segunda	GAT ATC CAT GAG GTT ACT ACA TTT C		
RPOB					
RpoBF	Gene Apicoplasto	Primeira e Segunda	ATT TTT GTG GAT ATG ATT TTG AAG ATG C	511	52°
rpoBR		Primeira e Segunda	TTT CCA TAT CTT CCA CAT AAT TTA TCT C		

* Rodada de amplificação em que os primers foram usados: Primeira (PCR): Primers utilizados apenas na primeira rodada de amplificação. Segunda (n-PCR): Primers utilizados apenas na segunda rodada de amplificação. Primeira e Segunda: Primers utilizados na primeira e segunda rodada de amplificação.

** Comprimento do produto de PCR obtido após a segunda rodada de amplificação.

*** Temperatura de anelamento utilizada para cada conjunto de primers.

Para determinação de identidade de nucleotídeos entre sequências gênicas de SAG2, SAG3 e SAG4 e outras sequências homólogas disponíveis no Genbank, foi empregado o programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013). Os cálculos de identidade foram realizados usando a matriz de distância p.

Árvores filogenéticas foram construídas pelo método de Máxima Verossimilhança. A história evolutiva, modelos de substituição de nucleotídeos e o método estatístico de bootstrap para avaliar a consistência dos ramos nas árvores, foram realizados com auxílio do programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

As sequências ITS1 de amostras de *S. falcatula*-like de pinguins foram comparadas com sequências disponíveis no Genbank. Nesta análise foram usadas as sequências de maior similaridade identificadas com a ferramenta de busca BLAST e somente aquelas que não tivessem sítios degenerados. Foram escolhidas 25 sequências gênicas com base neste critério. Para RPOB, também foram empregadas as sequências de maior similaridade obtidas por BLAST e cujos organismos tenham sido anotados inequivocamente.

5.3 RESULTADOS

Foram coletados no total, 514 amostras de tecidos de 330 indivíduos sendo: 342 de músculo peitoral, 86 de coração e 86 de cérebro (TABELA 2).

Tabela 2. Total de pinguins e tecidos coletados, por estado de encalhe da ave, nas duas campanhas realizadas.

ÓRGÃOS	ESTADO			TOTAL
	ESPÍRITO SANTO	RIO DE JANEIRO	BAHIA	
Músculo	206	101	35	342
Cérebro	41	34	11	86
Coração	40	35	11	86
Total Amostras	287	170	57	514
Total Indivíduos	132	138	60	330

O total de amostras (514) foi submetido a PCR direcionada ao *locus* 18S e 16 (3,0%) delas foram identificadas com este marcador como gênero *Sarcocystis*. Todas as amostras positivas eram de musculatura peitoral e de indivíduos diferentes, indicando que 4,8% dos pinguins analisados eram positivos.

Estas 16 amostras foram amplificadas com sucesso pela PCR direcionada ao *locus* ITS1 e pelas PCRs direcionadas a CytB, RPOB, SAG-2, SAG-3 e SAG-4. Em ITS1, todas as amostras foram idênticas entre si e relacionadas filogeneticamente a *S. falcatula*-like (FIGURA 1). Pela a identificação com o ITS1 todas as sequências foram 100% idênticas a *Sarcocystis* spp. clone 1334-4 (AY082647), ao genótipo I de *Sarocystis* spp. identificados em esporocistos de gambás didelfídeos no Brasil (VALADAS et al., 2016) e *S. falcatula* isolado 59-2016-RS-BR (KX265018) (KONRADT et al., 2017). Em CytB as amostras foram idênticas a *S. falcatula* isolado SF1 (KP871704) e a *S. falcatula* isolado 59-2016-RS-BR (KX265018). Para RPOB as sequências de *S. magellanicus* formam um clado bem suportado com *S. falcatula* e *S. lindsayi*, sendo este clado divergente de *S. neurona* SN138 (FIGURA 2).

Figura 1. Análise filogenética das sequências de *S. falcatula*-like de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) baseado no espaçador interno transcrito 1 (ITS1). A história evolutiva foi inferida através do método de máxima verossimilhança com base em modelo de substituição de nucleotídeo de Kimura 2 parâmetros. (■): Sequência de *S. falcatula*-like de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*).

Figura 2. Análise filogenética das sequências de *S. falcatula*-like de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) baseado RPOB. A história evolutiva foi inferida através do método de máxima verossimilhança com base em modelo de substituição de nucleotídeo de Tamura 3 parâmetros. (■): Sequencia de *S. falcatula*-like de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*).

As sequências SAG obtidas de 16 amostras foram 100% idênticas às sequências de alelos homólogos de *S. falcatula*-like identificados em esporocistos de gambás didelídeos no Brasil e classificados como tipos III (JN185358), III (JN185386) e XI (JN185800), como descrito por Monteiro et al. (2013). Para cada *locus* SAG, todas as amostras de pinguins foram idênticas entre si.

Em SAG2, as amostras de pinguim tiveram 99,5 e 97,3% de identidade com *S. falcatula* e *S. neurona*, respectivamente. Para SAG3, estes valores foram de 96,0% e 90,9%, respectivamente. Para SAG4, os valores de identidade foram de 92,5 e 91,6% com *S. falcatula* e *S. neurona*, respectivamente. Para estas comparações, foram usados os seguintes dados de *S. neurona* e *S. falcatula* disponíveis no Genbank: GQ851952 e GQ851953 (para SAG2 de *S. neurona* e *S. falcatula*, respectivamente), GQ851954 e GQ851956 (para SAG3 *S. neurona* e *S. falcatula*, respectivamente), GQ851958 e GQ851959 (para SAG4 de *S. neurona* e *S. falcatula*, respectivamente).

Anticorpos anti-*T.gondii* foram encontrados em 18 (12,5%) dos 145 indivíduos amostrados com títulos ≥ 20 (TABELA 3).

Tabela 3: Frequência de pinguins positivos para anticorpos anti- *Toxoplasma gondii*, por título, pelo Teste de Aglutinação Modificado (MAT ≥ 20).

Títulos de Anticorpos	No. Animais	%
<20	127	87,6
20	7	4,8
40	9	6,2
80	2	1,4
Total	145	100,0

Com relação à distribuição das aves reagentes, por estado pesquisado, o estado do Rio de Janeiro contou com o maior número de pinguins analisados e o estado do Espírito Santo a maior porcentagem de positivos (18,5%) (TABELA 4).

Tabela 4: Pinguins examinados e positivos para anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* por título (MAT ≥ 20) por estado de encalhe e sexo.

Estado	Examinados	Positivos (%)
Rio de Janeiro	67	6 (9,0)
Espírito Santo	54	10 (18,5)
Bahia	24	2 (8,3)
Sexo		
Indefinido	93	9 (9,7)
Feminino	39	6 (15,4)
Masculino	13	3 (23,1)

5.4 DISCUSSÃO

O MAT, utilizado no presente estudo, é considerado o teste mais sensível e específico para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em animais (DUBEY et al., 2010).

Apesar do teste não ter sido validado para detecção de *T. gondii* em pinguins, o mesmo já foi amplamente utilizado em outras espécies de aves, aquáticas ou não (DUBEY, 2010; GENNARI et al., 2016b) e o título de 20 é bastante superior ao padronizado para galinhas por Dubey et al. (2016) que isolou *T. gondii* em animais com títulos no MAT de 1:5.

Poucos são os dados na literatura científica sobre detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em pinguins, principalmente em animais de vida livre, alvo do presente estudo. Deem et al. (2010) pesquisaram anticorpos anti-*T. gondii*, através do MAT, em 298 pinguins de Galápagos (*Spheniscus mendiculus*) de vida livre, na ilha de Fernandina, Equador, com ponto de corte de 1:50, maior que o aqui utilizado (1:20) e encontraram ocorrência de 2,8%.

Gennari et al. (2016), com a mesma espécie de pinguins do presente estudo, e o mesmo ponto de corte no MAT, em aves de cativeiro, encontraram 28 dos 100 pinguins (28%) analisados positivos a anticorpos anti-*T. gondii*, valor maior que o dobro do aqui encontrado, indicando que a vida em cativeiro pode facilitar a infecção por patógenos.

Oocistos de *T. gondii* podem esporular e sobreviver em água do mar por vários meses (LINDSAY et al., 2003; FAYER et al., 2004; LINDSAY; DUBEY, 2009). Mamíferos marinhos, de diferentes grupos, cetáceos, pinnípedes e sirenianos, além de aves aquáticas, podem se infectar pelo consumo de água contendo oocisto. Cole et al. (2000) sugeriu que oocistos de *T. gondii*, presentes em fezes de gatos, podem adentrar o ambiente marinho e contaminar as águas e vários invertebrados, que podem funcionar como hospedeiros de transporte aos mamíferos e aves aquáticas. Lindsay et al. (2001) conseguiram infectar camundongos alimentados com ostras (*Crassostrea virginica*) experimentalmente infectadas.

Os pinguins-de-magalhães têm como sua principal dieta peixes tais como: sardinha, chicharro, manjuba e trilha, sendo a sardinha o mais frequente, mas também se alimentam de pequenos crustáceos filtradores como o *Euphausia superba*, conhecido como “Krill Antártico”, que assim como as ostras, podem possuir um papel importante na infecção destes animais.

No presente estudo, apesar de alguns animais serem soro positivo para *T. gondii*, este coccídio não foi isolado por bioensaio em camundongos e também não foi detectado molecularmente nos tecidos coletados.

Não houve concordância entre os achados da sorologia com os achados da pesquisa molecular no presente estudo. Animais sororeagentes não tiveram tecidos positivos para *T. gondii* pelas provas moleculares nem pelo bioensaio. Uma hipótese

levantada para explicar isto é que infecções por protozoários coccídios nem sempre produzem quantidade de cistos teciduais que permitam a detecção, uma vez que segundo Dubey (1997), o encontro de cistos em músculos é, em média de um cisto por 25-250 gramas em animais de maior porte, sendo considerado baixo.

Nesta pesquisa, as amostras de tecidos foram triadas com o uso de PCR direcionada a 18S para detectar ampla variedade de sarcocistídeos. Todas as amostras (n=16) que foram identificadas como gênero *Sarcocystis* pelo marcador 18S pertencem à mesma espécie, uma vez que também foram idênticas entre si com os demais marcadores (ITS1, SAG2, SAG3, SAG4, CytB e RPOB).

Em conjunto, a análise multilocus das amostras de tecido muscular de *S. magellanicus* permite concluir que o parasito identificado por métodos moleculares é do gênero *Sarcocystis* e estreitamente relacionado a *S. falcatula*. Os fragmentos ITS1, RPOB e CytB oriundos destas amostras são marcadamente similares com sequências oriundas de *S. falcatula* de *Phimosus infuscatus* encontrado no litoral do estado do Rio Grande do Sul (KONRADT et al., 2017) e com sequências de *S. falcatula* isolado SF1. O isolado SF1 foi originalmente obtido de tecidos de periquitos (*M. undulatus*) previamente inoculados com esporocistos de gambás (*D. virginiana*), isolado na Califórnia, Estados Unidos (MARSH et al., 1997).

Os alelos SAG2, SAG3 e SAG4, de *S. falcatula*-like de *S. magellanicus* são idênticos a alelos homólogos obtidos de amostras de esporocistos de *Sarcocystis* spp. eliminados por gambás didelfídeos no Brasil (MONTEIRO et al., 2013; VALADAS et al., 2016). Em conjunto, estes autores encontraram, em cerca de 50 amostras de esporocistos, 10 variantes para SAG2, 15 para SAG3 e 11 para SAG4 e sugerem que *Sarcocystis* transmitidos por didelfídeos podem produzir parasitos com diferentes combinações de alelos SAGs, o que conferiria ao parasito diferentes traços fenotípicos, como espectro de hospedeiro e patogenicidade. Entretanto, a despeito desta intensa abundância de alelos, todas as amostras detectadas neste estudo foram idênticas entre si para cada alelo. Ainda, combinação de SAG2, SAG3, SAG4 destas amostras é diferente da combinação encontrada em *S. falcatula* SF1, que possui, para estes *loci*, os alelos tipos X, XV e XII, respectivamente. Então, os resultados aqui encontrados parecem corroborar a hipótese formulada por MONTEIRO et al., 2013; VALADAS et al., 2016, visto que o agente encontrado em tecidos de pinguins deve ser uma variante de *S. falcatula* com uma combinação particular de SAGs.

Sarcocystis falcatula causam infecções agudas com quadros pulmonares graves e intenso crescimento de esquizontes em células endoteliais de capilares pulmonares de algumas espécies de aves (SMITH et al., 1987). Ocasionalmente, quadros neurológicos também parecem decorrer da infecção por este agente (HILLYER et al., 1991). Os mesmos autores descrevem um surto de sarcocistose em psitacídeos, com animais mostrando diversidade de sinais e alterações patológicas, desde lesões e sinais neurológicos até lesões e sinais respiratórios, o que seria compatível com uma possível diversidade de genótipos envolvidos no surto. O relato de Hillyer et al. (1991) não pode contar com identificação molecular e por isso essas inferências são especulativas, entretanto os resultados destes autores podem indicar que os Sarcocistídeos envolvidos naquele surto possuíam diversidade de combinações SAGs o que seria prontamente identificado com o método de discriminação molecular aqui empregado. Com efeito, o presente trabalho pode contribuir para o conhecimento etiológico das sarcocistoses em aves.

Numerosos surtos de sarcosporidiose aguda por *S. falcatula* têm sido relatados em aves das ordens Passeriformes, Psitacídeos, Columbiformes, Strigiformes e Falconiformes de cativeiro nas Américas (PAGE et al., 1989; SMITH et al., 1990; HILLYER et al., 1991; ODENING et al., 1994; DUBEY et al., 2001; SUEDEMEYER et al., 2001; CRAY et al., 2005; VILLAR et al., 2008; ECCO et al., 2008; GODOY et al., 2009;). Existem relatos que *S. falcatula* pode causar doença respiratória grave em psitacídeos de cativeiro (HILLYER et al., 1991; SUEDEMEYER et al., 2001; ECCO et al., 2008) tendo apenas dois relatos em aves de vida livre (WUNSCHMANN et al., 2010; KONRADT et al., 2017), diagnosticados com metodologias similares às do presente estudo. No caso dos pinguins deste estudo, todos estavam em reabilitação e vieram a óbito por causas naturais ou por eutanásia, quando estes se apresentavam muito debilitados, com fraturas graves e em sofrimento, não sendo possível determinar a causa da morte desses animais. Como a detecção de genes do parasito ocorreu em amostras de tecido muscular, infere-se que a forma de vida detectada deva ter sido sarcocistos, estruturas características da fase crônica da infecção e, portanto, pouco provável que o parasito estivesse causando doença no hospedeiro.

Para demonstrar a diversidade de enfermidades que podem acometer aves de ordens e espécies variadas, amostras aviárias (n = 827) submetidas à Universidade da Geórgia de 2006 a 2011 foram revisadas para determinar as entidades patológicas comuns. O estudo incluiu 153 espécies, com 64,5% de Psittaciformes, 11,3% de

Passeriformes, 7,9% de Galliformes, 3,8% de Columbiformes e 3,5% de Anseriformes. Foram identificados agentes infecciosos em 226 aves (27,3%) e em Sphenisciformes, somente três aves (1%) foram diagnosticadas com *Aspergillus* spp. e uma com poxvirus. *Sarcocystis* spp. foi identificado através de exames histopatológicos em somente cinco de 112 aves da ordem Psittaciformes e em uma de sete aves da ordem Falconiformes (NEMETH et al., 2016).

As sequências aqui geradas foram provenientes de músculo peitoral dos pinguins e não temos como precisar quando essas aves foram infectadas. Luznar et al. (2001) infectaram experimentalmente *Molothrus ater* (Pássaro-vaqueiro-de-cabeça-marrom), uma ave aquática migratória e observaram que sarcocistos de *S. falcatula* permaneceram viáveis por, pelo menos, 40 semanas pós-infecção no hospedeiro intermediário natural, indicando uma longa viabilidade dos cistos nos hospedeiros. Além disso, sabe-se que gambás infectados experimentalmente com sarcocistos de *S. falcatula* de tecidos de *Molothrus ater* eliminaram esporocistos até serem eutanasiados, 200 dias após infecção (PORTER et al., 2001), confirmando a importante relação parasita-hospedeiro entre os gambás e o *S. falcatula*. Essas informações nos levam a pensar como as aves do presente estudo se infectaram? Os pinguins pesquisados eram todos jovens (entre um a quatro anos), grande parte deles encontrava-se na primeira migração e os didelfídeos são parte necessária na cadeia epidemiológica e não são encontrados nas colônias dessas aves. Assim, estudos mais detalhados, com enfoque na cadeia de transmissão do agente se fazem necessários.

Este é o primeiro relato de *S. falcatula* com identidade gênica aos achados anteriormente descritos no Brasil e o primeiro relato de soropositivos para anticorpos anti - *T. gondii* em pinguins-de-magalhães de vida livre no Brasil.

5.6 REFERÊNCIAS

- LEVINE, N. D. Taxonomy of the Sporozoa. **Journal of Parasitology**, v. 56, p. 208–209, 1970.
- SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1293-1302, 2001.
- TOMLEY, F. M., SOLDATI D. S. Mix and match modules: structure and function of microneme protein in apicomplexan parasites. **Parasitology Today**, v. 31, p.1303- 1310, 2001.
- MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; HECKEROTH, A. R.; JOHNSON, A. M.; TENTER, A. M. Phylogenetic analyses based on fulllength large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveal that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1545-1556, 1999.
- TENTER, A. M.; BARTA, J. R.; BEVERIDGE, I.; DUSZYNSKI, D. W.; MEHLHORN, H.; MORRISON, D. A.; THOMPSON, A. R. C.; CONRAD, P. A. The conceptual basis for a new classification of the coccidian. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 595-616, 2002.
- MORRISON, D. A.; BORNSTEINA, S.; THEBOA, P.; WERNERYB, U.; KINNEB, J. MATTSSONA, J. G. The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidian (Sporozoa). **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 501–514, 2004.
- SAMARASINGHE, B.; JOHNSON, J.; RYAN, U. Phylogenetic analysis of *Cystoisospora* species at the rRNA ITS1 *locus* and development of a PCR-RFLP assay. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 592-595, 2008.
- SMITH, D. D.; FRENKEL, J. K. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and east central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmission. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 1, p. 15-21, 1995.
- HILLYER, E. V.; ANDERSON, M. P.; GREINER, E. C.; ATKINSON, C. T.; FRENKEL, J. K. An outbreak of *Sarcocystis* in a collection of psittacines. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 4, p. 434-445, 1991.
- ANDRADE, L.H.M.; LUGARINI, C.; OLIVEIRA, R.A.S.; SILVA, L.T.R.; MARVULO, M.F.V.; GARCIA, J.E.; DUBEY, J.P.; SILVA, J.C.R. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em aves silvestres de três Unidades de Conservação Federais da Paraíba e da Bahia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 2, p. 103-107, 2016.
- CABRAL, A. D.; GAMA, A. R.; SODRÉ, M. M.; SAVANI, E. S. M. M.; GALVÃO-DIAS, M. A.; JORDÃO, L. R.; PENA, H. F. J. First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from bats (Mammalia: Chiroptera). **Veterinary parasitology**, v.193, n.1, p. 100-104, 2013.

CAÑÓN-FRANCO, W. A.; ARAÚJO, F. A. P.; LÓPEZ-OROZCO, N.; JARDIM, M. M. A.; KEID, L. B.; DALLA-ROSA, C.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: Molecular detection and genotypic characterization. **Veterinary parasitology**, v.197, n.3, p. 462-469, 2013.

COLE, R.A.; LINDSAY, D.S.; HOWE, D.K.; RODERICK, C.L.; DUBEY, J.P.; THOMAS, N.J.; BAETEN, L.A. Biological and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **Journal of Parasitology**, v. 86, p.526–530, 2000.

CONTENTE, A.P.A.; DOMINGUES, P.F.; SILVA, R.C. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em avestruzes (*Struthio camelus*) de criatórios comerciais no estado de São Paulo. **Brazilian Journal Veterinary Reserch Animal Science**, v.46, n.3, p.175-180. 2009.

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

DA SILVA, R. C.; LANGONI, H.; SU, C.; DA SILVA, A. V. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: New atypical genotypes and the clonal type II strain identified. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 173–177, 2011.

DE ALMEIDA, J. C.; DE MELO, R. P. B.; DE MORAIS PEDROSA, C.; DA SILVA SANTOS, M.; DE BARROS, L. D.; GARCIA, J. L.; MOTA, R. A. First isolation and RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from crab-eating fox (*Cerdocyon thous*—Linnaeus, 1766). **Acta Tropica**, v. 169, p. 26-29, 2017.

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

DUBEY, J. P. Bradyzoite- Induced Murine Toxoplasmosis: Stage Conversion, Pathogenesis, and Tissue Cyst Formation in Mice Fed Bradyzoites of Different Strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 592-602, 1997.

DUBEY, J.P.; LAURIN, E.; KWOK, O.C.H. Validation of the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens by using cat and mouse bioassay. **Parasitology**, v.143, p. 314-319, 2016.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2010, p. 313.

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

DUBEY, J.P.; CALERO-BERNAL, R.; ROSENTHAL, B.M.; SPEER, C.A., FAYER, R., Sarcocystosis of animals and humans, 2 ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1–481. 2015.

DUBEY, J.P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v.19, p. 337–339, 1987.

ECCO, R.; LUPPI, M. M.; MALTA, M. C. C.; ARAUJO, M. R.; GUEDES, R. M. C.; SHIVAPRASAD, H. L. An outbreak of sarcocystosis in psittacines and a pigeon in a zoological collection in Brazil. **Avian diseases**, v. 52, n.4, p. 706-710, 2008.

FAYER, R.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 531–536, 2004.

GARCÍA-BORBOROGLU, P. G.; BOERSMA, P. D. (Ed.). **Penguins** – natural history and conservation. Seattle: University of Washington Press, 2013. p 233-263.

GENNARI S.M.; OGRZEWALSKA M.; SOARES H.S.; SARAIVA D.G.; PINTER A.; LABRUNA M.B.; DUBEY J.P. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in birds from the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.200, n.1, p.193-197, 2013.

GENNARI, S. M.; RASO, T.F.; GUIDA, F.J.V.; PENA, H.F.J.; SOARES, H.S.; DUBEY J.P. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in scavenging black vultures (*Coragyps atratus*) do Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Scienc**, v. 54, n. 2, p. 96-99, 2017.

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

GENNARI, S.M.; NIEMEYER, C.; CATÃO-DIAS, J.L.; SOARES, H.S.; ACOSTA, I.C.L.; DIAS, R.A.; RIBEIRO, J.D.; LASSALVIA, C.; MARACINI, P.; KOLESHNIKOVAS, C.K.M.; MAYORGA, L.F.S.P.; DUBEY, J.P. Survey Of *Toxoplasma Gondii* Antibodies In Magellanic Penguins (*Spheniscus Magellanicus* Forster, 1781). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 47, p. 364-366, 2016a.

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

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

HOVE, T.; MUKARATIRWA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in farm-reared ostrich and wild game species from Zimbabwe. **Acta Tropica**, v. 94, n. 1, p. 49-53, 2005.

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A. L.; RIZZO, L. V.; BELFORT, R. JR.; VITOR, R. W.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L. D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n. 6, p. 942-949, 2006.

KONRADT, G.; BIANCHI, M. V.; LEITE-FILHO, R. V.; DA SILVA, B. Z.; SOARES, R. M.; PAVARINI, S. P.; DRIEMEIER, D. Necrotizing meningoencephalitis caused by *Sarcocystis falcatula* in bare-faced ibis (*Phimosus infuscatus*). **Parasitology Research**, p.1-4, 2017.

LEITE, A.S.; ALVES L.C.; FAUSTINO M.A.G. Serological survey of toxoplasmosis in birds from Cracidae family in a wild bird center facility at Pernambuco State, Northeast of Brazil. **Medicina Veterinária**, v.1, p.55-57, 2007.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 4, p. 1019-1020, 2009.

LINDSAY, D.S.; COLLINS, M.V.; MITCHELL, S.M.; COLE, R.A.; FLICK, G.J.; WETCH, C.N.; LINDQUIST, A.; DUBEY, J.P. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, p. 687–688, 2003.

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

LUZNAR, S. L.; AVERY, M. L.; DAME, J. B.; MACKAY, R. J.; GREINER, E. C. Development of *Sarcocystis falcatula* in its intermediate host, the brown-headed cowbird (*Molothrus ater*). **Veterinary parasitology**, v. 95, n.2, p. 327-334, 2001.

MADER, A.; SERAFINI, P.; SANDER, M.; BOERSMA, P.D.; BORBOROGLU, P.G.; RUOPPOLO, V. Projeto Nacional de Monitoramento do pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) 2010–2015. **Boletim Pinguins no Brasil**, n81, abril de 2011. **Brasília (Brazil): ICMBio**, p.8, 2011.

MAROBIN, L.; FLÔRES, M. L.; RIZZATTI, B. B.; SEGABINAZI, S. D.; LAGAGGIO, V. R. A.; GRIGULO, M.; SCALCO, M. A. *Toxoplasma gondii* antibodies prevalence in *Rhea americana* from several farms of Rio Grande do Sul State. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n.1, p. 5-9, 2004.

MARSH, A. E.; BARR, B. C.; LAKRITZ, J.; NORDHAUSEN, R.; MADIGAN, J. E.; CONRAD, P. A. Experimental infection of nude mice as a model for *Sarcocystis neurona*-associated encephalitis. **Parasitology research**, v. 83, n. 7, p. 706-711, 1997.

MASON, R.W.; HARTLEY, W.J.; DUBEY, J.P. Lethal toxoplasmosis in a little penguin (*Eudyptula minor*) from Tasmania. **Journal of Parasitology**, v. 77, p. 328, 1991.

MILLER, E.A. Minimum standards for wildlife rehabilitation. St. Cloud (MN): **National Wildlife Rehabilitation Association**, 116 p. 2012.

MONTEIRO, R. M.; KEID, L. B.; RICHTZENHAIN, L. J.; VALADAS, S. Y.; MULLER, G.; SOARES, R. M. Extensively variable surface antigens of *Sarcocystis* spp. infecting Brazilian marsupials in the genus *Didelphis* occur in myriad allelic combinations, suggesting sexual recombination has aided their diversification. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 1-2, p. 64-70, 2013.

NEMETH, N. M.; GONZALEZ-ASTUDILLO, V.; OESTERLE, P. T.; HOWERTH, E. W. A 5-Year Retrospective Review of Avian Diseases Diagnosed at the Department of Pathology, University of Georgia. **Journal of Comparative Pathology**, v.155, n.2, p. 105-120, 2016.

ODENING, K.; WESEMEIER, H.H.; PINKOWSKI, M.; WALTER, G.; SEDLACZEK, J.; BOCKHARDT, I. European hare and European rabbit (Lagomorpha) as intermediate hosts of *Sarcocystis* species (Sporozoa) in central Europe. **Acta Protozoologica**, v. 33, p. 177–189, 1994.

PAGE, C.D.; SCHMIDT, R.E.; HUBBARD, G.B.; LANGLINAIS, P.C. *Sarcocystis myocarditis* in a red lorry (*Eos bornea*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 20, p. 461–464, 1989.

PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

PENA, H. F.; MARVULO, M. F.; HORTA, M. C.; SILVA, M. A.; SILVA, J. C.; SIQUEIRA, D. B.; LIMA, P. A.; VITALIANO, S. N.; GENNARI, S. M. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3–4, p. 377–381, 2011.

PLOEG, M.; ULTEE, T.; KIK, M. Disseminated toxoplasmosis in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Avian Dis**, v. 55, p. 701–703, 2011.

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

RATCLIFFE, H.L.; WORTH, M.D. Toxoplasmosis of captive wild birds and mammals. **American Journal of Pathology**, v. 27, p. 655–667, 1951.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; MARSON, P. M.; SILVA, R. C. D.; LANGONI, H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp. in road-killed wild mammals from the Central Western Region of the State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49, n.5, p. 602-607, 2016.

SERCUNDES, M.K.; VALADAS, S.Y.O.B.; KEID, L.B.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; FERREIRA, H.L.; VITOR, R.W.A.; GREGORI, F.; SOARES, R.M. Molecular phylogeny of Toxoplasmatinae: comparison between inferences based on mitochondrial and apicoplast genetic sequences. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 82–89, 2016.

SICK, H. Ornitologia Brasileira. 3rd ed. Rio de Janeiro (Brazil): Editora Nova Fronteira; 910 p. 2001.

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

SMITH, J.H.; NEILL, P.J.G.; DILLARD III, E.A.; BOX, E.D. Pathology of experimental *Sarcocystis falcatula* infections of canaries (*Serinus canarius*) and pigeons (*Columba livia*). *Journal of Parasitology*, v. 76, p. 59–68, 1990.

SOARES, H. S.; ALVES, N. D.; PEREIRA, R. H. M. A.; MATOS, S. M.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; PEIXOTO, G. C. X. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em emas (*Rhea americana*) do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.2, p.489-491, 2010.

SOARES, R.M.; LOPES, E.G.; KEID, L.B.; SERCUNDES, M.K.; MARTINS, J.; RICHTZENHAIN, L.J. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the *H. heydorni* RAPD fragment AP10. **Veterinary Parasitology**, v.175, n. 1e2, pag.168-172, 2011.

SU, C.; SHWAB, E. K.; ZHOU, P.; ZHU, X. Q.; DUBEY, J. P. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1-11, 2010.

SUEDMEYER, W.; BERMUDEZ, A. J.; BARR, B. C.; MARSH, A. E. Acute pulmonary *Sarcocystis falcatula*-like infection in three Victoria crowned pigeons (*Goura victoria*) housed indoors. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.32, n.2, p. 252-256, 2001.

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

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

VITALIANO, S.N.; SOARES, H.S.; MINERVINO, A.H.H.; SANTOS, A.L.Q.; WERTHER, K.; MARVULO, M.F.V.; SIQUEIRA, D.B.; PENA, H.F.J.; SOARES, R.M.; SU, C.; GENNARI, S.M. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.3, n.3, p. 276-283, 2014.

WENDTE, J.M.; MILLER, M.A.; NANDRA, A.K.; PEAT, S.M.; CROSBIE, P.R. Limited genetic diversity among *Sarcocystis neurona* strains infecting southern sea otters precludes distinction between marine and terrestrial isolates. **Veterinary parasitology**, v. 169, n. 1, p. 37-44, 2010.

WILLIAMS, T.D. **The penguins**: Spheniscidae. Oxford: Oxford University Press, 1995. 295 p.

WUNSCHMANN, A.; REJMANEK, D.; CONRAD, P.A.; HALL, N.; CRUZ-MARTINEZ, L.; VAUGHN, S.B.; BARR, B.C. Natural fatal *Sarcocystis falcatula* infections in free-ranging eagles in North America. *J Vet Diagn Investig*, v. 22, p. 282–289, 2010.

YAI, L. E. O.; RAGOZO, A. M.; SOARES, R. M.; PENA, H. F.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 332–337, 2009.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ALMEIDA, A. B.; KRINDGES, M. M. 1; DE BARROS, L.D.; GARCIA, J.L.; CAMILLO, G.; VOGEL, F.S.F.; ARAUJO, D.N.; STEFANI, L.M.; DA SILVA, A.S. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in rheas (*Rhea americana*) and ostriches (*Struthio camelus*) from farms of different Brazilian regions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 437-439, 2013.
- ANDRADE, L.H.M.; LUGARINI, C.; OLIVEIRA, R.A.S.; SILVA, L.T.R.; MARVULO, M.F.V.; GARCIA, J.E.; DUBEY, J.P.; SILVA, J.C.R. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em aves silvestres de três Unidades de Conservação Federais da Paraíba e da Bahia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 2, p. 103-107, 2016.
- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; SILVA, K. F.; JUSI, M. M. G.; MACHADO, S. T. Z.; BORTOLLI, C. P. DE; FALCADE, M.; SOUSA, L.; ALEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; MACHADO, R. Z. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Captive Neotropical and Exotic Wild Canids and Felids. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 5, p. 1007–1009, 2010.
- ASHBURN, D. History and general epidemiology. In: HO-YEN, D.O.; JOSS, A.W.L. (Ed.). Human toxoplasmosis. **Oxford: Oxford University Press**, 1992, p.1-25.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C. F.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 55–62, 2003.
- BARROS, L. D. D.; TARODA, A.; ZULPO, D. L.; CUNHA, I. A. L. D.; SAMMI, A. S.; CARDIM, S. T.; GARCIA, J. L. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from eared doves (*Zenaida auriculata*) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 4, p. 443-448, 2014.
- BARTA, J. R.; SCHRENZEL, M. D.; CARRENO, R.; RIDEOUT, B. A. The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the genus *Isospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as 89 the correct genus for *Isospora* species infecting mammals. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 726–727, 2005.
- BERTRANPETIT, E.; JOMBART, T.; PARADIS, E.; PENA, H.; DUBEY, J.; SU, C.; AJZENBERG, D. Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 48, p. 150-155, 2017.
- BOERSMA, P. D.; REDSTOCK, G. A. Climate change increases reproductive failure in magellanic penguins. **Plos One**, v. 9, n. 1, 2014.
- BOX, E. D.; MEIER, J. L.; SMITH, J. E. Description of *Sarcocystis falcatula* Stiles, 1893, a parasite of birds and opossums. **Journal of Protozoology**, v. 31, p. 521-524, 1984.
- BRANCO, J. O.; BARBIERI, E.; FRACASSO, H. A. A. Técnicas de pesquisa em aves marinhas. In: STRAUBE, F. C.; PIACENTINI, V. Q.; ACCORDI, I. A.; CÂNDIDO, J. F. **Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento**. [S.l.]: Techical Books Editora, 2010, p. 219- 235.

CABRAL, A. D.; GAMA, A. R.; SODRÉ, M. M.; SAVANI, E. S. M. M.; GALVÃO-DIAS, M. A.; JORDÃO, L. R.; PENA, H. F. J. First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from bats (Mammalia: Chiroptera). **Veterinary parasitology**, v.193, n.1, p. 100-104, 2013.

CALVERT, R.; CLAY, R.; LASCELLES, B.; SHARPE, C.J.; TAYLOR, J. **BirdLife International Species factsheet: *Spheniscus magellanicus***. <http://www.birdlife.org>. 2013. Acesso em: 20/10/2015.

CANFIELD, P. J.; HARTLEY, W. J AND DUBEY, J. P. Lesions of toxoplasmosis in Australian marsupials. **Journal of Comparative Pathology**, v. 103, p. 159- 167,1990.

CAÑÓN-FRANCO, W. A.; ARAÚJO, F. A. P.; LÓPEZ-OROZCO, N.; JARDIM, M. M. A.; KEID, L. B.; DALLA-ROSA, C.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: molecular detection and genotypic characterization. **Veterinary parasitology**, v.197,n. 3, p. 462-469, 2013.

CAÑÓN-FRANCO, W. A.; LÓPEZ-OROZCO, N.; CHRISTOFF, A. U.; DE CASTILHO, C. S.; DE ARAÚJO, F. A. P.; VERMA, S. K.; DUBEY, J.P.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M. Molecular and morphologic characterization of *Sarcocystis felis* (Apicomplexa: Sarcocystidae) in South American wild felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 217, p. 15-20, 2016.

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, p. 840-844, 2011.

CARRASCO L.; LIMA Jr J.S.; HALFEN D.C.; SALGUERO F.J.; SANCHEZCORDÓN P.; BECKER G. Systemic Aspergillosis in an Oiled Magallanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Veterinary Medicine**. 48: 551-554. 2001.

CARRENO, R. A.; J. R. BARTA. An eimeriid origin of isosporoid coccidian with Stieda bodies as shown by phylogenetic analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 77–83, 1999.

CHEADLE, M. A.; TANHAUSER, S. M.; DAME, J. B.; SELLON, D. C.; HINES, M.; GINN, P. E.; MACKAY, R. J.; GREINER, E. C. The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. **International Journal for Parasitology** v. 31, p. 330–335, 2001a.

CHEADLE, M. A.; YOWELL, C. A.; SELLON, D. C.; HINES, M.; GINN, P.E.; MARSH, A. E.; DAME, J. B.; GREINER, E. C. The striped skunk (*Mephitis mephitis*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 843–849, 2001b.

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

COMITÉ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS. (CBRO). **Listas das aves do Brasil**. 10. ed. 2011. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 14 set. 2015.

CONTENTE, A.P.A.; DOMINGUES, P.F.; SILVA, R.C. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em avestruzes (*Struthio camelus*) de criatórios comerciais no estado de São Paulo. **Brazilian Journal Veterinary Reserch Animal Science**, v.46, n.3, p.175-180. 2009.

CUNNINGHAM, A. A.; BUXTON, D.; THOMSON, K. M. An epidemic of toxoplasmosis in a captive colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 107, p. 207-219, 1992.

DA SILVA, R. C.; LANGONI, H.; SU, C.; DA SILVA, A. V. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: New atypical genotypes and the clonal type II strain identified. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 173–177, 2011.

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

DE ALMEIDA, J. C.; DE MELO, R. P. B.; DE MORAIS PEDROSA, C.; DA SILVA SANTOS, M.; DE BARROS, L. D.; GARCIA, J. L.; MOTA, R. A. First isolation and RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from crab-eating fox (*Cerdocyon thous*—Linnaeus, 1766). **Acta Tropica**, v. 169, p. 26-29, 2017.

DE MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; WADA, M. Y.; JONES, J. L.; TUBOI, S.H.; CARMO, E. H.; RAMALHO, W. M.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R.M. T.; DA SILVA, A. J.; MOURA, I.; DUBEY, J. P.; GARRETT, D. O. Waterborne outbreak of toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 326–329, 2006.

DEEM, S. L.; MERKEL, J.; BALLWEBER, L.; VARGAS, F.H.; CRUZ, M. B.; PARKER, P. G. Exposure to *Toxoplasma gondii* in Galapagos Penguins (*Spheniscus mendiculus*) and Flightless Cormorants (*Phalacrocorax harrisi*) in the Galapagos Islands, Ecuador. **Journal of Wildlife Diseases**, 46(3), p. 1005–1011, 2010.

DEMAR, M.; AJZENBERG, D.; SERRURIER, B.; DARDÉ, M.L.; CARME, B. Atypical *Toxoplasma gondii* strain from a free-living jaguar (*Panthera onca*) in French Guiana. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**.78, 195–7. 2008.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 562-568, 1980.

DOLEZEL, D.; KOUDELA, B.; JIRKU, M.; HYPISA, V.; OBORNÍK, M.; VOT.PKA, J.; MODR, D.; SLAPETA, J. R.; LUKES, J. Phylogenetic analysis of *Sarcocystis* spp. of mammals and reptiles supports the coevolution of *Sarcocystis* spp. with their final hosts. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 795–798, 1999.

DRESSEN, D. W. *Toxoplasma gondii* infections in wildlife. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, p. 274-276, 1990.

DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 75–77, 1998b.

DUBEY, J. P. Toxoplasma, Sarcocystis, Neospora and other cyst-forming coccidian of human and animals. In: KREIER, J.P. (Ed.). Parasitic protozoa. 2 ed. San Diego: Academic Press, v. 6, p. 1-158. 1993.

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

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis, sarcocystosis, isosporosis, and ciclosporosis. In: PALMER, S. R.; SOULSBY, E.J.L.; SIMPSON, D.J.H. (Ed.). Zoonoses. **Oxford: Oxford University Press**, p.579-597, 1998a.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 2, p.166-170, 1986.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., p. 220, 1988.

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

DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, p. 337-339, 1987.

DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; SUNDAR, N.; VIANNA, M. C. B.; BANDINI, L. M.; YAI, L. E. O.; KWOK, O. C. H.; SU, C. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 93, n. 1, p. 60-64, 2007.

DUBEY, J. P.; GOODWIN, M. A.; RUFF, M. D.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; WILKINS, G. C.; THULLIEZ, P. Experimental toxoplasmosis in chukar partridges (*Alectoris graeca*). **Avian Pathology**, v. 24, p. 95-107, 1995.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; NISHI, S. M.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: Unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 99-105, 2002.

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

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v.139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; RAJENDRAN, C.; YABSLEY, M. J.; THOMAS, N. J.; BECKMEN, K. B.; SINNETT, D.; RUID, D.; HART, J.; FAIR, P. A.; MCFEE, W. E.; SHEARN-BOCHSLER, V.; KWOK, O. C.; FERREIRA, L. R.; CHOUDHARY, S.; FARIA, E. B.; ZHOU, H.; FELIX, T. A.; SU, C. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 1139–1147, 2011.

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

DUBEY, J.P.; CALERO-BERNAL, R.; ROSENTHAL, B.M.; SPEER, C.A., FAYER, R., *Sarcocystosis of animals and humans*, 2 ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1–481. 2015a.

DUBEY, J.P.; HAMIR, A.N.; KIRKPATRICK, C.E.; TODD, K.S.; RUPPRECHT, C.E. *Sarcocystis felis* sp. n. (Protozoa: Sarcocystidae) from the bobcat (*Felis rufus*). **Journal of the Helminthological Society of Washington**. 59, 227–229.1992.

DUBEY, J.P.; LEVY, M.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; DAHL, E.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. Tissue distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. **Journal of Parasitology**. 90, 1015–1018. 2004.

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

DUBEY, J.P.; VENTURINI, M.C.; VENTURINI, L.; PISCOPO, M.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M.C.; LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Argentina. **Journal of Parasitology**, 89, 1063–1064. 2003.

DUBEY, L. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. *Sarcocystosis of Animals and Man*. Boca Raton: CRC Press, 1989.

FEAGIN, J. E. The extrachromosomal DNAs of apicomplexan parasites. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, p. 81–104, 1994.

FENGER, C. K.; GRANSTROM, D. E.; LANGEMEIER, J. L.; STAMPER, S.; DONAHUE, J. M.; PATTERSON S.; GAJADHAR, A. A.; MARTENIUK, J. V.; XIAOMIN, Z.; DUBEY, J.P. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n.6, p. 916-919, 1995.

FERGUSON, D. J.; HENRIQUEZ, F. L.; KIRISITS, M. J.; MUENCH, S. P.; PRIGGE, S. T.; RICE, D. W.; ROBERTS, C. W.; MCLEOD, R. L. Maternal inheritance and stage-specific variation of the apicoplast in *Toxoplasma gondii* during development in the intermediate and definitive host. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 4, p. 814– 826, 2005.

FERREIRA, I. M. R.; VIDAL, J. E.; DE MATTOS, C. C. B.; DE MATTOS, L. C.; QU, D.; SU, C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP–PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 190–195, 2011.

FORNAZARI, F.; TEIXEIRA, C. R.; DA SILVA, R. C.; LEIVA, M.; ALMEIDA, S. C.; LANGONI, H. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* among Brazilian white-eared opossums (*Didelphis albiventris*). **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 238–241, 2011.

FOURNIER, G. F. S. R.; LOPES, M. G.; MARCILI, A.; RAMIREZ, D. G.; ACOSTA, I. C. L.; FERREIRA, J. I. G. S.; CABRAL, A. D.; LIMA, J. T. R.; PENA, H. F. J.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from forest fragments of the municipality of Natal, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 4, p. 501-508, 2014.

FRENKEL, J.K.; HEYDORN, A.O.; MEHLHORN, H.; ROMMEL, M. Sarcocystinae: Nomina dubia and available names. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 58, p. 115–139, 1979.

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 JUNIOR, V.; BARBOSA, L.; SERRA, S. Magellanic penguin mortality in 2008 along the SW Atlantic coast. **Marine Pollution Bulletin, Amsterdam**, v. 60, p. 1652–1657, 2010.

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

GENNARI S.M.; OGRZEWALSKA M.; SOARES H.S.; SARAIVA D.G.; PINTER A.; LABRUNA M.B.; DUBEY J.P. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in birds from the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.200, n.1, p.193-197, 2013.

GENNARI, S. M.; RASO, T.F.; GUIDA, F.J.V.; PENA, H.F.J.; SOARES, H.S.; DUBEY J.P. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in scavenging black vultures (*Coragyps atratus*) do Brasil. Brazilian **Journal of Veterinary Research Animal Scienc**, v. 54, n. 2, p. 96-99, 2017.

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

GENNARI, S.M.; NIEMEYER, C.; CATÃO-DIAS, J.L.; SOARES, H.S.; ACOSTA, I.C.L.; DIAS, R.A.; RIBEIRO, J.D.; LASSALVIA, C.; MARACINI, P.; KOLESNIKOVAS, C.K.M.; MAYORGA, L.F.S.P.; DUBEY, J.P. Survey Of *Toxoplasma Gondii* Antibodies In Magellanic Penguins (*Spheniscus Magellanicus* Forster, 1781). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 47, p. 364-366, 2016a.

HEYDORN, A.O.; GESTRICH, R.; MEHLHORN, H.; ROMMEL, M. Proposal for a new nomenclature of the Sarcosporidia. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 48, p. 73–82, 1975.

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

HOVE, T.; MUKARATIRWA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in farm-reared ostrich and wild game species from Zimbabwe. **Acta Tropica**, v. 94, n. 1, p. 49-53, 2005.

HUMPHREYS, J. G.; STEWART, R. L.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of hunter-killed White-Tailed deer in Pennsylvania. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 2, p.172-173, 1995.

JACKSON, M. H.; HUTCHINSON, W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Advances in Parasitology**, v. 28, p. 55-105, 1989.

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

KHAN, A.; DUBEY, J. P.; SU, C.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY L. D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal of Parasitology**, Cairns, v. 41, n. 6, p. 645–655, 2011.

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A. L.; RIZZO, L. V.; BELFORT, R. JR.; VITOR, R. W.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L. D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n. 6, p. 942-949, 2006.

KOHLER, S.; DELWICHE, C. F.; DENNY, P. W.; TILNEY, L. G.; WEBSTER, P.; WILSON, R. J. M.; PALMER, J. D.; ROSS, D. S. A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. **Science**, v. 275, n. 5305, p. 1485-1489, 1997.

KONRADT, G.; BIANCHI, M. V.; LEITE-FILHO, R. V.; DA SILVA, B. Z.; SOARES, R. M.; PAVARINI, S. P.; DRIEMEIER, D. Necrotizing meningoencephalitis caused by *Sarcocystis falcatula* in bare-faced ibis (*Phimosus infuscatus*). **Parasitology Research**, p.1-4, 2017.

LEITE, A.S.; ALVES L.C.; FAUSTINO M.A.G. Serological survey of toxoplasmosis in birds from Cracidae family in a wild bird center facility at Pernambuco State, Northeast of Brazil. **Medicina Veterinária**, v.1, p.55-57, 2007.

LEVINE, N. D. Taxonomy of the Sporozoa. **Journal of Parasitology**, v. 56, p. 208–209, 1970.

LEVINE, N. D. The Protozoan Phylum Apicomplexa, **Boca Raton FL: CRC Press**, 1988.

LEVINE, N.D. Nomenclature of *Sarcocystis* in the ox and sheep and of fecal coccidia of the dog and cat. **Journal of Parasitology**, 63, 36–51, 1977.

LOPES, C. S.; FRANCO, P. S.; SILVA, N. M.; SILVA, D. A. O.; FERRO, E. A. V.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M.; MINEO, J. R. Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 12, p. 1-11, 2016.

MADER, A.; SANDER, M.; JUNIOR, G.C. Ciclo sazonal de mortalidade do pinguim- de- magalhaes, *Spheniscus magellanicus* influenciado por fatores antropicos e climáticos na costa do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 18, n.3, p. 228-233, 2010.

MADER, A.; SERAFINI, P.; SANDER, M.; BOERSMA P.D.; BORBOROGLU, P. G.; RUOPPOLO, V. Projeto Nacional de Monitoramento do Pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) 2010-2015. **Boletim Pinguins no Brasil**, 1, abril de 2011.

MAROBIN, L.; FLÔRES, M.L.; RIZZATTI, B.B.; SEGABINAZI, S.D.; LAGAGGIO, V.R.A.; GRIGULO, M.; SCALCO, M.A. *Toxoplasma gondii* antibodies prevalence in *Rhea americana* from several farms of Rio Grande do Sul State. **Brazilian Journal Veterinary Reserch Animal Science**, 41, 1, 5-9. 2004.

MARTÍNEZ-CARRASCO, C.; BERNABÉ, A.; ORTIZ, J. M.; ALONSO, F.D. Experimental toxoplasmosis in red-legged partridges (*Alectoris rufa*) fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 55-60, 2005.

MASON, R.W.; HARTLEY, W.J.; DUBEY, J.P. Lethal toxoplasmosis in a little penguin (*Eudyptula minor*) from Tasmania. **Journal of Parasitology**. 77(2): 328. 1991.

MAYORGA, L.F.S.P.; MEDEIROS, L.C.C.; BHERING, R.C.C. Instituto de Pesquisa e Reabilitação de Aves Marinhas (IPRAM) no Espírito Santo. **Boletim Pinguins no Brasil**, 2012.

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

MINERVINO, A. H. H.; SOARES, H. S.; BARRÊTO-JÚNIOR, R. A.; NEVES, K. A. L.; JESUS PENA, H. F.; ORTOLANI, E. L.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive wild mammals and birds in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 41, n. 3, p. 572–574, 2010.

MODR, D.; VOT.PKA, J.; SVOBODOVÁ, M. Note on the taxonomy of *Frenkelia microti* (Findlay & Middleton, 1934) (Apicomplexa: Sarcocystidae). **Systematic Parasitology**, v. 58, p. 185-187, 2004.

MONTEIRO, R. M.; KEID, L. B.; RICHTZENHAIN, L. J.; VALADAS, S. Y.; MULLER, G.; SOARES, R. M. Extensively variable surface antigens of *Sarcocystis* spp. infecting Brazilian marsupials in the genus *Didelphis* occur in myriad allelic combinations, suggesting sexual recombination has aided their diversification. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 1-2, p. 64-70, 2013.

MORRISON, D. A.; BORNSTEINA, S.; THEBOA, P.; WERNERYB, U.; KINNEB, J. MATTSSONA, J. G. The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidia (Sporozoa). **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 501–514, 2004.

MUGRIDGE, N. B.; MORRISON, D. A.; HECKEROTH, A. R.; JOHNSON, A. M.; TENTER, A. M. Phylogenetic analyses based on fulllength large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveal that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1545-1556, 1999.

MULLANEY, T.; MURPHY, A. J.; KIUPEL, M.; BELL, J. B.; ROSSANO, M. G.; MANSFIELD, L. S. Evidence to support horses as natural intermediate hosts for *Sarcocystis neurona*. **Veterinary Parasitology**, v. 133, p. 27-36, 2005.

NICOLLE, M. M. C.; MANCEAUX, I. Sur une infection à corps de Leishmann (organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences**. Paris, v. 147, p. 763-766, 1908.

ODENING, K. The present state of species systematics in *Sarcocystis Lankester*, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). **Systematic Parasitology**, v. 41, n. 3, p. 209- 233, 1998.

OLIAS, P.; GRUBER, A.D.; HAFEZ, H.M.; HEYDORN, A.O.; MEHLHORN, H.; LIERZ, M. *Sarcocystis calchasi* sp. nov. of the domestic pigeon (*Columba livia* f. *domestica*) and the Northern Goshawk (*Accipiter gentilis*): Light and electron microscopical characteristics. **The journal Parasitology Research**, v. 106, p. 577–585, 2010.

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

OLIAS, P.; OLIAS, L.; KRÜCKEN, J.; LIERZ, M.; GRUBER, A.D. High prevalence of *Sarcocystis calchasi* sporocysts in European *Accipiter* hawks. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 230–236, 2011.

OLIVEIRA, R.P.N.; SANTOS, B.G.; DUARTE, B.R.; NOGUEIRAC.H.O.; SILVEIRA, L.S.; BARBOSA, L.A.; RODRIGUES, A.B.F. Morfologia, topografia e distribuição das papilas linguais em Pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*). **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 5, N. 7, Ed. 154, Art. 1040, 2011.

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

PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

PENA, H. F.; MARVULO, M. F.; HORTA, M. C.; SILVA, M. A.; SILVA, J. C.; SIQUEIRA, D. B.; LIMA, P. A.; VITALIANO, S. N.; GENNARI, S. M. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3–4, p. 377–381, 2011.

PENA, H.F.J.; VITALIANO, S.N.; BELTRAME, M.A.V.; PEREIRA, F.E.L.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: New genotypes and a new SAG3 marker allele. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 111-117, 2013.

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

PIATT, J. F.; SYDEMAN, W. J.; WISES, F. Introduction: a modern role for seabirds as indicators. **Marine Ecology Progress**, v. 352, p. 199-204, 2007.

PLOEG, M.; ULTEE, T.; KIK, M. Disseminated toxoplasmosis in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Avian Disease**, v. 55, p. 701–703. 2011.

PONTES, L.A.E.; PETRUCCI, M.P.; BARBOSA, L.A.; FERREIRA, F.S.; SILVEIRA, L.S.; VIEIRA-DA-MOTTA, O. Aspergilose e candidíase em pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus* Foster, 1781) resgatados na costa do Espírito Santo, Brasil. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da Vida, v. 27, p. 57-59, 2007.

RAJENDRAN, C.; SU, C.; DUBEY, J. P. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. **Infection Genetics and Evolution**, v. 12, p. 359–368, 2012.

RATCLIFFE, H.L.; WORTH, C.B. Toxoplasmosis of captive wild birds and mammals. **American Journal of Pathology**, v. 27, p. 655–667, 1951.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; MARSON, P. M.; SILVA, R. C. D.; LANGONI, H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp. in road-killed wild mammals from the Central Western Region of the State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49, n.5, p. 602-607, 2016.

RIMOLDI, G.; SPEER, B.; WELLEHAN, J.F.X.; BRADWAY, D.S.; WRIGHT, L.; REAVILL, D.; BARR, B.C.; CHILDRESS, A.; SHIVAPRASAD, H.L.; CHIN, R.P. An outbreak of *Sarcocystis calchasi* encephalitis in multiple psittacine species within an enclosed zoological aviary. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, p. 775–781, 2013.

RUOPPOLO, V.; VANSTREELS, R. E. T.; WOEHLE, E. J.; HEREDIA, S. A. R.; ADORNES, A. C.; DA SILVA-FILHO, R. P.; 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, n.7, p. 1309-1317, 2012.

SAMARASINGHE, B.; JOHNSON, J.; RYAN, U. Phylogenetic analysis of *Cystoisospora* species at the rRNA ITS1 locus and development of a PCR-RFLP assay. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 592-595, 2008.

SEPÚLVEDA, M. A., SEGUEL, M., ALVARADO-RYBAK, M., VERDUGO, C., MUÑOZ-ZANZI, C., TAMAYO, R. Postmortem findings in four south American sea lions (*Otaria byronia*) from an urban colony in Valdivia, Chile. **Journal of wildlife diseases**, v. 51, n.1, p. 279-282, 2015.

SERCUNDES, M.K.; VALADAS, S.Y.O.B.; KEID, L.B.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; FERREIRA, H.L.; VITOR, R.W.A.; GREGORI, F.; SOARES, R.M. Molecular phylogeny of Toxoplasmatinae: comparison between inferences based on mitochondrial and apicoplast genetic sequences. **Revista Brasileira de Parasitologia Vetereinária**, v. 25, p. 82–89, 2016.

SHWAB, E.K.; ZHU, X.Q.; MAJUMDAR, D.; PENA, H.F.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, p. 453–461, 2014.

SILVA, N.W.X.; VARGAS, M.P.; ZANINI, S.F.; ALMEIDA, A.T.S.; CARVALHO, M.A.G.; ALMADA, G.L. Levantamento preliminar de pinguins de magalhães (*Spheniscus magellanicus*) (Sphenisciformes) reabilitados na costa capixaba. In: **Congresso ABRAVAS**, 5.; Encontro ABRAVAS, 10, 2001, São Paulo. Anais eletrônico. Disponível em: < <http://www.abravas.com.br/anais/anais2001.zip> >. Acesso em: 05 jan. 2011.

SLAPETA, J. R.; KYSELOVÁ, I.; RICHARDSON, A. O.; MODR., D.; LUKES, J. Phylogeny and sequence variability of the *Sarcocystis singaporensis* Zaman and Colley, (1975) 1976 ssrDNA. **Parasitology Researcher**, v. 88, p. 810–815, 2002.

SMITH, D. D.; FRENKEL, J. K. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and east central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmission. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 1, p. 15-21, 1995.

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

SMITH, J. H.; NEILL, P. J. G.; DILLARD, E. A.; BOX, E. D. Pathology of experimental *Sarcocystis falcatula* infections of Canaries (*Serinus canaries*) and Pigeons (*Columba livia*). **The Journal of Parasitology**, v. 76, n. 1, p. 59-68, 1990.

SOARES, H. S.; ALVES, N. D.; PEREIRA, R. H. M. A.; MATOS, S. M.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; PEIXOTO, G. C. X. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em emas (*Rhea americana*) do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.2, p.489-491, 2010.

SOARES, R.M.; LOPES, E.G.; KEID, L.B.; SERCUNDES, M.K.; MARTINS, J.; RICHTZENHAIN, L.J. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the *H. heydorni* RAPD fragment AP10. **Veterinary Parasitology**, v.175, n. 1e2, pag.168-172, 2011.

SOBRAL, C. A.; AMENDOEIRA, M. R. R.; TEVA, A.; PATEL, B. N.; KLEIN, C. H. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, p. 37– 41, 2005.

SOGORB, F. S.; JAMRA, L. F.; GUIMARÃES, E. C. DEANE, M. P. Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, p. 314-320, 1972.

SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1293-1302, 2001.

SOIORIO, M. R.; GENNARI, S. M.; SOARES, H. S.; DUBEY, J. P.; HARTLEY, A. C. Z.; FERREIRA, F. *Toxoplasma gondii* Antibodies in Wild White-Lipped Peccary (*Tayassu pecari*) From Peru. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1232, 2010.

SOUZA, M.A.M.; CRUZ, P.B.S.; WALLAUER, J.; SILVA, G.S. Pinguins de magalhães (*Spheniscus magellanicus* forster, 1781) contaminados por petróleo encontrados na ilha de santa catarina, Brasil. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v.16, n.1, p. 29-34, 2010.

SPERB, P. Mais de mil pinguins são encontrados mortos no litoral gaúcho. Disponível em: < <http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2014/08/1502878-mais-de-mil-pinguins-sao-encontrados-mortos-no-litoral-gaucho.shtml> >. Acesso em: 19 set. 2014.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parasita de conigli incontrato nelle lesionianatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il kala-azar dell'umo. Nota preliminare. **Revista Sociedade Scientifica São Paulo**, v. 3, p. 109-112, 1908.

STABENOW, C.S.; EDERLI, N.B.; LOPES, C.W.G.; DE OLIVEIRA, F.C.R. *Didelphis aurita* (Marsupialia: Didelphidae): A new host for *Sarcocystis lindsayi* (Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v. 98, p. 1262–1265, 2012.

STOKES, D. L.; BOERSMA, P.D.E; DAVIS, L.S. Satellite tracking of Magellanic Penguin migration. **Condor**, 100:376-381. 1998.

SU, C.; SHWAB, E. K.; ZHOU, P.; ZHU, X. Q.; DUBEY, J. P. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1-11, 2010.

TENTER, A. M.; BARTA, J. R.; BEVERIDGE, I.; DUSZYNSKI, D. W.; MEHLHORN, H.; MORRISON, D. A.; THOMPSON, A. R. C.; CONRAD, P. A. The conceptual basis for a new classification of the coccidian. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 595-616, 2002.

TOMLEY, F. M., SOLDATI D. S. Mix and match modules: structure and function of microneme protein in apicomplexan parasites. **Parasitology Today**, v. 31, p.1303- 1310. 2001.

UPTON, S. Suborder Eimeriorina Léger, 1911. In: LEE, J. J., HUTNER, S. H., BOVEE, E. C. (Ed.). The Illustrated Guide to the Protozoa, 2 ed. Lawrence, KS: Allen Press, 2001. p. 318–339.

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

VERMA, S.K.; CALERO-BERNAL, R.; LOVALLO, M.J.; SWEENEY, A.R.; GRIGG, M.E.; DUBEY, J.P. Detection of *Sarcocystis* spp. infection in bobcats (*Lynx rufus*). **Veterinary Parasitology**, v. 212, p. 422–426. 2015.

VITALIANO, S, N.; SILVA, D. A. O.; MINEO, T. W. P.; FERREIRA, R. A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 253-260, 2004.

VITALIANO, S.N.; SOARES, H.S.; MINERVINO, A.H.H.; SANTOS, A.L.Q.; WERTHER, K.; MARVULO, M.F.V.; SIQUEIRA, D.B.; PENA, H.F.J.; SOARES, R.M.; SU, C.; GENNARI, S.M. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.3, n.3, p. 276-283, 2014.

VOTPKA, J.; HYPESA, V.; JIRKŮ, M.; FLEGR, J.; VÁVRA, J.; LUKES, J. Molecular phylogenetic relatedness of *Frenkelia* spp. (Protozoa, Apicomplexa) to *Sarcocystis falcatula* Stiles 1893: is the genus *Sarcocystis* paraphyletic. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, n. 1, p.137-141, 1998.

WENDTE, J. M.; GIBSON, A. K.; GRIGG, M. E. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: New perspectives from parasite genotypes in wildlife. **Veterinary Parasitology**, v.182, n. 1, p. 96-111, 2011.

WUNSCHMANN, A.; REJMANEK, D.; CONRAD, P.A.; HALL, N.; CRUZ-MARTINEZ, L.; VAUGHN, S.B.; BARR, B.C. Natural fatal *Sarcocystis falcatula* infections in free-ranging eagles in North America. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 282-289, 2010.

YAI, L. E. O.; RAGOZO, A. M.; SOARES, R. M.; PENA, H. F.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 332–337, 2009.

YAP, G. S.; SHER, A. Cell-mediated Immunity to *Toxoplasma gondii*: Initiation, Regulation and Effector Function. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 201, p. 240-247, 1999.