

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL – PPGCA**

ANA PAULA REMOR SEBOLT

**SOROPREVALÊNCIA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Toxoplasma gondii EM MAMÍFEROS E AVES MARINHAS DE VIDA LIVRE NO
LITORAL SUL DE SANTA CATARINA, BRASIL**

LAGES

2024

ANA PAULA REMOR SEBOLT

**SOROPREVALÊNCIA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Toxoplasma gondii EM MAMÍFEROS E AVES MARINHAS DE VIDA LIVRE NO
LITORAL SUL DE SANTA CATARINA, BRASIL**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

Orientador: Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros

LAGES

2024

ANA PAULA REMOR SEBOLT

**SOROPREVALÊNCIA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Toxoplasma gondii EM MAMÍFEROS E AVES MARINHAS DE VIDA LIVRE NO
LITORAL SUL DE SANTA CATARINA, BRASIL**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Sanidade animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

Orientador: Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros

BANCA EXAMINADORA

Dr. Anderson Barbosa de Moura

Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Membros:

Dr. Andreas Lazaros Chryssafidis

Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Dra. Lucia Padilha Cury Thomaz de Aquino

Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Dra. Erica dos Santos Martins Duarte

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Dr. George Rêgo Albuquerque

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)

Lages, dia 24 de julho de 2024.

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Sebolt, Ana Paula Remor

Soroprevalência, isolamento e caracterização molecular de *Toxoplasma gondii* em mamíferos e aves marinhas de vida livre no litoral Sul de Santa Catarina, Brasil / Ana Paula Remor Sebolt. -- 2024.

75 p.

Orientador: Anderson Barbosa de Moura

Coorientador: Luiz Daniel de Barros

Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2024.

1. Toxoplasmose. 2. animais marinhos. 3. PCR-RFLP. 4. RIFI.
I. Barbosa de Moura, Anderson. II. de Barros, Luiz Daniel . III.
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.
IV. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, eterno exemplo de caráter e bondade, meu mais sincero agradecimento. Ela, junto ao meu pai, quem incentivou e apoiou a leitura, os estudos e a continuidade na vida acadêmica. Sua dedicação em guardar e enviar as amostras com carinho ao laboratório, assegurando que chegassem em segurança, foi fundamental para o progresso desta pesquisa. Mesmo com a distância que nos separa, espero que, de alguma forma, esteja comemorando comigo a finalização de mais este ciclo.

Ao meu pai, também meu grande exemplo, por todo apoio e companheirismo nos momentos de dificuldade. Por compartilhar comigo o entusiasmo e conhecimento sobre o mar e os animais que nele habitam.

Às minhas irmãs e sobrinhos, meus companheiros, sempre empolgados em saber mais sobre a pesquisa.

À Thaís, que sempre me salvou nos momentos complicados, por todo o apoio e companheirismo durante essa jornada.

À Amanda, Guilherme, Yago, Vic e Esdras, apesar da distância, sempre estiveram presentes.

Ao prof. Alexandre Tavela, quem me iniciou no mundo da pesquisa e da parasitologia, responsável pelo que me fez caminhar até aqui.

Ao prof. Anderson, pelo companheirismo e amizade, sempre presente nesses seis anos de orientação, que possibilitou meu crescimento como acadêmica e deu grandes oportunidades.

Ao prof. Luiz Daniel, que prontamente aceitou ser coorientador desse trabalho, por toda a ajuda e apoio para a realização do bioensaio e análises moleculares.

Ao Dr. Chunlei Su, que gentilmente auxiliou na análise dos resultados da genotipagem.

À Ana Carolina, pela amizade e parceria durante minha estadia em Londrina, assim como o pessoal do Laboratório de Protozoologia da UEL, Rafa, João, Bia, Jorgiana, professores Fernando e João Luís.

Ao prof. Pedro e toda a equipe do Projeto de Monitoramento de Praias (CERES/UEDESC), responsáveis pelo fornecimento das amostras e essenciais para o desenvolvimento e realização do projeto.

Aos ICs do projeto, especialmente Fran e Felipe, amigos que foram fundamentais em todos os momentos, que faziam das análises e rotina do laboratório momentos de muita alegria e diversão.

A todos os integrantes do LAPAR, pelo apoio e ajuda em diversos momentos, sempre na torcida pelo sucesso do projeto.

À prof. Lúcia e prof. Andreas, por todo o conhecimento repassado, companheirismo e disposição para contribuir com o projeto.

Aos membros da branca, prof. George e Erica, pelas contribuições para melhorar o trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), por meio do Edital de Chamada Pública FAPESC 48/2022 - Apoio à infraestrutura para grupos de pesquisa da UDESC - Termo de Outorga: 2023TR000236.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa em Toxoplasmose Humana e Animal: Uma visão de Saúde Única - CNPq 406572/2022-4

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Se pude enxergar mais longe, foi porque me apoiei em ombros de gigantes” (Isaac Newton)

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito mundialmente distribuído, afetando todos os animais homeotérmicos, incluindo humanos. Estudos indicam que a América do Sul, especialmente o Brasil, abriga a maior diversidade genética do parasito, com cepas altamente virulentas e genótipos atípicos. Esta diversidade está associada ao ciclo silvestre do parasito, embora dados sobre essa população animal ainda sejam escassos. O objetivo do trabalho foi realizar o isolamento e caracterização molecular das cepas de *T. gondii* encontradas, e verificar a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em exsudato cárneo de tecidos de animais marinhos monitorados pelo Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS), no litoral sul de Santa Catarina. Dos animais que vieram a óbito (n=372), após necropsia, amostras de tecidos (cérebro, pulmão, coração, fígado e musculatura esquelética) formaram um “pool” que foi utilizado para o bioensaio em camundongos, visando o isolamento do parasito. Desses tecidos, foram obtidas amostras de exsudato cárneo para a pesquisa de anticorpos contra o parasito, realizada por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando conjugado anti-IgY de galinha e "cut-off" de 1:2. Soros de galinhas, positivos e negativos para *T. gondii*, foram usados para comparação. Detectaram-se anticorpos contra *T. gondii* em 125 (33,6%) das amostras analisadas, incluindo 79 (21,2%) *Spheniscus magellanicus* (Pinguins-de-Magalhães), 20 (9,1%) *Larus dominicanus* (Gaivotões), cinco (1,3%) *Sula leucogaster* (Atobás-pardos), dois (0,5%) Trinta-Réis-de-Bicos-Vermelhos, um (0,2%) *Phalacrocorax brasilianus* (Biguá), uma Pardela-preta e uma Pardela-sombria. A presença de anticorpos indica contato com o parasito, por meio de alimentos contaminados. Para o bioensaio, camundongos inoculados com o produto da digestão péptica dos tecidos foram observados por até 45 dias pós-inoculação para identificar sinais clínicos de toxoplasmose, sendo então eutanasiados. Dos camundongos que morreram naturalmente e dos eutanasiados, coletou-se sangue para pesquisa de anticorpos (RIFI; ≥ 16) e órgãos (cérebro, pulmão e coração). Fragmentos de cérebro foram avaliados por “squash” para pesquisa de cistos, e o restante foi armazenado a -20°C para extração de DNA, PCR e genotipagem por RFLP, usando marcadores SAG1, 5'-SAG2, 3'-SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Alt. SAG2 e Apico. Dos camundongos eutanasiados também se pesquisou a presença do parasito em lavado intraperitoneal e “imprint” de pulmão. Dos 90 bioensaios, 38 foram positivos para *T. gondii* (detecção de cistos e/ou taquizoítos e/ou anticorpos). Um isolado de gaivotão (TgLdBr4) e um de toninha (TgPbBr1) apresentaram o genótipo #170 da plataforma ToxoDB. Os outros quatro genótipos (TgLdBr1, TgLdBr2, TgLdBr3 e TgLdBr5) isolados não corresponderam a nenhum da plataforma,

indicando serem novos genótipos. A pesquisa revelou grande diversidade genética de *T. gondii* em animais marinhos no Sul do Brasil, destacando a importância de mais estudos para elucidar a epidemiologia do parasito nesse ambiente.

Palavras-chaves: Toxoplasmose, animais marinhos, PCR-RFLP, RIFI.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a parasite distributed worldwide, affecting all homeothermic animals, including humans. Studies indicate that South America, especially Brazil, harbors the greatest genetic diversity of the parasite, with highly virulent strains and atypical genotypes. This diversity is associated with the sylvatic cycle of the parasite, although data on this animal population are still scarce. The objective of the study was to isolate and molecularly characterize the *T. gondii* strains found, and to verify the occurrence of anti-*T. gondii* antibodies in meat exudate from tissues of marine animals monitored by the Santos Basin Beach Monitoring Project (PMP-BS), on the southern coast of Santa Catarina. From the animals that died (n=372), after necropsy, tissue samples (brain, lung, heart, liver, and skeletal muscle) formed a “pool” that was used for the bioassay in mice, aiming at the isolation of the parasite. From these tissues, samples of meat exudate were obtained for the investigation of antibodies against the parasite, performed through the Indirect Immunofluorescence Reaction (IFAT), using chicken anti-IgY conjugate, and a cut-off of 1:2. Sera from chickens, positive and negative for *T. gondii*, were used for comparison. Antibodies against *T. gondii* were detected in 125 (33.6%) of the analyzed samples, including 79 (21.2%) *Spheniscus magellanicus* (Magellanic penguins), 20 (9.1%) *Larus dominicanus* (gulls), five (1.3%) *Sula leucogaster* (brown boobies), two (0.5%) Red-billed terns, one (0.2%) *Phalacrocorax brasilianus* (cormorant), one Black Shearwater and one Sombre Shearwater. The presence of antibodies indicates contact with the parasite through contaminated food. For the bioassay, mice inoculated with the product of peptic digestion of tissues were observed for up to 45 days post-inoculation to identify clinical signs of toxoplasmosis, and were then euthanized. From mice that died naturally and from those euthanized, blood was collected for antibody testing (IFAT; ≥ 16) and organs (brain, lung, and heart). Brain fragments were evaluated by “squash” to search for cysts, and the remainder was stored at -20°C for DNA extraction, PCR and genotyping by RFLP, using markers SAG1, 5'-SAG2, 3'-SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Alt. SAG2 and Apico. From euthanized mice, the presence of the parasite was also investigated in intraperitoneal lavage and lung imprint. Of the 90 bioassays, 38 were positive for *T. gondii* (detecting cysts and tachyzoites and antibodies). One isolate from a gull (TgLdBr4) and one from a porpoise (TgPbBr1) presented genotype #170 from the ToxoDB platform. The other four genotypes (TgLdBr1, TgLdBr2, TgLdBr3, and TgLdBr5) isolated did not correspond to any of the platforms, indicating that they are new genotypes. The research revealed the great

genetic diversity of *T. gondii* in marine animals in southern Brazil, highlighting the importance of further studies to elucidate the epidemiology of the parasite in this environment.

Keywords: Toxoplasmosis, marine animals, PCR-RFLP, RIFI.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pesquisa de anticorpos contra <i>Toxoplasma gondii</i> em aves marinhas ao redor do mundo	24
Tabela 2 - Pesquisa de anticorpos contra <i>Toxoplasma gondii</i> em mamíferos marinhos ao redor do mundo	25
Tabela 3 - Detecção e caracterização molecular de <i>Toxoplasma gondii</i> em aves e mamíferos marinhos ao redor do mundo	27
Tabela 4 - Achados anatomopatológicos em estudo com <i>Toxoplasma gondii</i> em aves e mamíferos marinhos	28
Tabela 5 - Classificação das carcaças de animais marinhos de acordo com os códigos e características.....	33
Tabela 6 - Primers para PCR-RFPL multiplex multilocus nested (Mn-PCR-RFPL).....	39
Tabela 7 - Número de amostras analisadas por classificação taxonômica, idade e gênero.....	44
Tabela 8 - Distribuição de bioensaios positivos de acordo com a espécie de animal marinha avaliada, técnica de diagnóstico realizada e manifestação de sinais clínicos.....	45
Tabela 9 - Ocorrência de anticorpos contra <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de exsudato cárneo de aves marinhas de vida livre no litoral Sul de Santa Catarina, Brasil	47
Tabela 10 - Distribuição dos títulos analisados pela RIFI para anticorpos contra <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de exsudato cárneo de aves marinhas do litoral Sul de SC, Brasil	49
Tabela 11 - Caracterização genotípica dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos de animais marinhos no litoral Sul de Santa Catarina.	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização da área de estudo e de atuação da Unidade de estabilização da fauna marinha da UDESC-CERES, Santa Catarina, Brasil.	32
Figura 2 - Número de amostras de animais marinhos por classe animal.	43
Figura 3 - A: Cisto tecidual de <i>T. gondii</i> em sistema nervoso central de camundongo; B: Taquizoíto de <i>T. gondii</i> em lavado peritoneal de camundongo.....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	<i>Toxoplasma gondii</i>	16
2.2	DIAGNÓSTICO	18
2.2.1	Métodos sorológicos	18
2.2.2	Isolamento do agente	20
2.2.3	Caracterização molecular	20
2.3	<i>Toxoplasma gondii</i> EM ANIMAIS MARINHOS	21
3	HIPÓTESES	31
4	OBJETIVOS	31
4.1	OBJETIVO GERAL	31
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5	METODOLOGIA	31
5.1	ÁREA DE ESTUDO, AMOSTRAGEM E SELEÇÃO DOS ANIMAIS	31
5.1.1	Área de estudo	31
5.1.2	Amostragem e seleção dos animais	33
5.2	ISOLAMENTO DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	34
5.2.1	Digestão péptica dos tecidos	34
5.2.2	Bioensaio em camundongos	34
5.2.3	Pesquisa de <i>Toxoplasma gondii</i> em tecidos de camundongos	35
5.2.4	Sorologia dos camundongos	36
5.3	EXTRAÇÃO DE DNA	36
5.4	ANÁLISE MOLECULAR	36
5.4.1	PCR 529 pb	36
5.4.2	PCR-RFLP 18S rRNA	37
5.5	GENOTIPAGEM MULTILOCUS PCR-RFLP	37
5.6	OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS EM AMOSTRAS DE EXSUDATO CÁRNEO (<i>JUICE MEAT</i>)	38
5.7	COMISSÃO DE ÉTICA	43
6	RESULTADOS	43
6.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	43
6.2	BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS	45

6.3 OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS EM AMOSTRAS DE EXSUDATO CÁRNEO (<i>MEAT JUICE</i>).....	47
6.4 ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	49
7 DISCUSSÃO.....	50
8 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA-UDESC	71
APÊNDICE B – AUTORIZAÇÃO ABIO (IBAMA)	72
.....	75

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um dos parasitos mais estudados mundialmente dada sua importância na medicina humana e veterinária, e que infecta uma ampla gama de hospedeiros, como seres humanos, animais domésticos e silvestres (Almeria; Dubey, 2021; Dubey, 2022). Estima-se que um terço da população mundial já tenha sido infectada por *T. gondii*, considerado um grande problema de saúde única, ocasionando grandes prejuízos ao sistema público de saúde e na produção animal (Aguirre *et al.*, 2019; Dubey, Jitender P. *et al.*, 2020; Ybañez; Ybañez; Nishikawa, 2020).

Os felídeos domésticos e selvagens, únicos hospedeiros definitivos, são capazes de eliminar milhões de oocistos durante um curto período quando infectados (Almeria; Dubey, 2021; VanWormer *et al.*, 2016). Esses oocistos podem atingir águas costeiras e estuários por meio do escoamento de áreas agrícolas, urbanas e efluentes de água e esgoto não tratados (Fayer; Dubey; Lindsay, 2004; VanWormer *et al.*, 2016). Já foi observado que oocistos podem esporular e se manterem viáveis por até 24 meses no ambiente marinho e por pelo menos 18 meses em água contendo ácido sulfúrico a 2% em temperatura de 4°C. Além disso, resistem a soluções detergentes ou desinfetantes, como hipoclorito de sódio, principalmente por suas características morfológicas que conferem resistência (Lindsay *et al.*, 2003; Lindsay; Dubey, 2009; Shapiro *et al.*, 2019).

Anteriormente, a estrutura molecular de *T. gondii* foi dividida em três genótipos clonais, denominados tipos I, II e III, encontrados principalmente na Europa e América do Norte. Atualmente, já foi observada que a estrutura molecular do parasito é mais complexa, especialmente pela circulação de cepas não clonais e bastante diversas, principalmente nas Américas Central e do Sul. Em relação à virulência das cepas circulantes nessas regiões, de 427 isolados, 61% tiveram alta virulência para camundongos. Em ambientes naturais, o ciclo silvestre de *T. gondii* pode favorecer o desenvolvimento de genótipos altamente virulentos (Howe; Sibley, 1995; Shwab *et al.*, 2014; Shwab *et al.*, 2018).

Nos animais marinhos a forma de infecção mais frequente ainda não foi completamente elucidada. Acredita-se que animais de hábitos filtradores possam reter os oocistos presentes em águas marinhas, servindo como fonte de infecção ao serem ingeridos por outros animais e até mesmo humanos. Diversos trabalhos já confirmaram a retenção e bioacumulação de oocistos de *T. gondii* em sardinhas e anchovas (Massie *et al.*, 2010), crustáceos (Lindsay *et al.*, 2004;

Esmerini; Gennari; Pena, 2010; Bigot-Clivot *et al.*, 2016), ostras e mexilhões (Lindsay *et al.*, 2004; Esmerini; Gennari; Pena, 2010).

A pesquisa e detecção de *T. gondii* em animais silvestres atualmente são realizadas, normalmente, por meio da sorologia, quando em animais de cativeiro, e exames *post-mortem* em animais de vida livre. Esses animais desempenham um papel fundamental na manutenção e transmissão de *T. gondii*. Mesmo limitado, novos genótipos têm sido frequentemente encontrados nesses animais no Brasil. Embora análises sorológicas sejam feitas com maior frequência, análises moleculares para identificar os genótipos circulantes nesse ambiente ainda são necessárias (Dubey *et al.*, 2003; Vitaliano *et al.*, 2014).

Visto que *T. gondii* tem a capacidade de infectar as mais diversas espécies de animais e humanos, além de apresentar uma ampla diversidade genética que está intimamente relacionada à virulência das cepas, investigar sua presença no ambiente marinho pode ser uma importante ferramenta para elucidar o fluxo de parasitos “terrestres” no meio aquático.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii foi descrito pela primeira vez por Splendore (1908) e Nicolle e Manceaux (1908). No Brasil, Splendore (1908) identificou o protozoário em um coelho de laboratório mas acreditou tratar-se do gênero *Leishmania*. Nicolle e Manceaux (1908), na Tunísia, encontraram o protozoário em tecidos de um roedor silvestre da espécie *Ctenodactylus gundi*, classificando-o como *Leishmania gondii*. No entanto, os mesmos pesquisadores em 1909, reclassificaram-no como *Toxoplasma gondii* com base na morfologia dos taquizoítos (do grego toxo = arco e plasma = vida) (Dubey, 2008).

T. gondii é um protozoário intracelular obrigatório, de distribuição mundial classificado no Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eimeriorina e Família Sarcocystidae (Dubey, 2022). Tem os felídeos como os únicos hospedeiros definitivos, onde ocorre o ciclo enteroepitelial sexuado, e são capazes de infectar todos os animais endotérmicos, inclusive os próprios felídeos, como hospedeiros intermediários (Bowman, 2020; Dubey, 2022).

Os felídeos se infectam após a ingestão de qualquer uma das três estruturas de *T. gondii* e o período pré-patente (PPP) varia, de acordo com a quantidade da forma ingerida, sendo de três a 10 dias após a ingestão de bradizoítos e de 18 a 19 dias após ingestão de oocistos esporulados e taquizoítos, respectivamente (Dubey, 2022). Nesses animais, ocorre o ciclo

enteroepitelial com uma fase assexuada (esquizogonia) e sexuada (gametogonia), culminando com a eliminação de oocistos não infectantes contendo um esporonte durante o período de uma a três semanas (Jones; Dubey, 2010). Para infectarem novos hospedeiros, os oocistos eliminados necessitam, obrigatoriamente, passar pelo processo de esporulação no ambiente, que pode levar de um a cinco dias, conforme condições adequadas de temperatura e umidade (20°C e 65%, respectivamente) (Lindsay *et al.*, 1997; Dubey, 2004). Nesse processo são formados no oocisto dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada, que ao serem ingeridos, eclodem, invadem as células do epitélio intestinal de seus hospedeiros, e realizam o ciclo assexuado por endodiogenia, formando estruturas de rápida multiplicação, denominadas taquizoítos. Essas estruturas têm a capacidade de migrar para outros sítios e dar origem a cistos teciduais contendo bradizoítos localizados, principalmente, no cérebro, olhos, musculaturas esquelética e cardíaca e, menos frequente, nos pulmões e rins (Dubey, 2004; Bowman, 2020; Dubey, 2022).

A infecção pode ocorrer por vias distintas, dentre elas: pela via fecal-oral, com a ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados eliminados por felídeos; por carnivorismo, com a ingestão de tecidos de animais homeotérmicos, contaminados com cistos teciduais contendo bradizoítos, ou por taquizoítos; e pela forma transplacentária, com a migração ativa de taquizoítos através da placenta (Dubey, 2020, 2022). Além disso, também pode ocorrer a transmissão via transfusão sanguínea e pelo coito, relacionada a indivíduos durante a fase aguda (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2015, 2018; Assoni *et al.*, 2024; Flegr; Klapilová; Kaňková, 2014; Hlaváčová *et al.*, 2021)

A patogenicidade da infecção nos hospedeiros depende de diversos fatores, como a susceptibilidade de cada espécie, virulência da cepa do parasito e a forma de infecção, visto que a ingestão de oocistos pode ocasionar quadros clínicos mais graves quando comparada à ingestão de cistos teciduais (Hill; Dubey, 2002; Dubey, 2004). A infecção por *T. gondii* em imunocompetentes não ocasiona manifestações clínicas, porém, em casos de infecção durante a gestação e em hospedeiros imunossuprimidos as manifestações clínicas podem ser consideradas severas (Rostami *et al.*, 2020).

Estima-se que um terço da população humana mundial já tenha sido infectado com o parasito (Dubey, 2022). No Brasil, algumas populações de determinadas regiões já atingiram a prevalência de até 80% (Dubey *et al.*, 2012) Além disso, o Brasil é considerado o país com a maior prevalência da infecção em mulheres grávidas (61.2%; 58.2-64.1%) e a América do Sul apresenta a mais alta prevalência para o mesmo grupo dentre os demais continentes (95% IC, 56.2%; 50.5-62.8%) (Dubey *et al.*, 2012; Rostami *et al.*, 2020; Almeria; Dubey, 2021). Ainda,

na América do Sul já foram detectadas cepas de maior virulência causando formas clínicas graves em indivíduos hígidos (Carme *et al.*, 2009).

Pelo fato de ser considerada uma das mais importantes zoonoses no mundo, o interesse no diagnóstico em animais se dá nas espécies que compartilham do mesmo ambiente ou servem de fonte de alimento ao ser humano (Sogorb *et al.*, 1972). Isolados de *T. gondii* de amostras animais e humanas foram agrupados em três linhagens clonais denominadas tipos I, II e III, predominantes nos EUA e na Europa. A linhagem do tipo II tem sido a mais presente em animais e humanos nessas regiões (Howe; Sibley, 1995; Ajzenberg *et al.*, 2002; Fekkar *et al.*, 2011; VERMA *et al.*, 2015; Vilares *et al.*, 2017). No entanto, isolados da América do Sul indicam uma maior variabilidade genética quando comparados aos dos EUA e Europa, contribuindo para os registros de linhagens atípicas e genótipos recombinantes, especialmente no Brasil (SHWAB *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014).

Uma grande diversidade genética foi observada por Pena et al (2008), que classificaram quatro genótipos, denominados BrI, BrII, BrIII e BrIV, como linhagens clonais brasileiras. Estudos sugerem que os animais silvestres apresentam uma maior diversidade genética do parasito que os animais domésticos e/ou de produção (Velmurugan; Su; Dubey, 2009; Dubey, J. P. *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2011). Contudo, até o presente momento, há pouca informação acerca dos genótipos circulantes entre os animais silvestres no Brasil, notadamente os marinhos. Desta forma, esforços são necessários para que sejam determinados os genótipos circulantes e o papel da infecção nesses animais, bem como a implicação zoonótica dessa situação (Gerhold *et al.*, 2017).

2.2 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da infecção por *T. gondii* é baseado na utilização de diversos métodos, como sorológicos, moleculares, histopatológicos ou a associação dos mesmos, levando em consideração as particularidades da espécie em estudo (Dubey, 2022).

2.2.1 Métodos sorológicos

Os testes sorológicos são os mais utilizados em estudos epidemiológicos do parasito. Ainda que inúmeros métodos estejam disponíveis, o achado de uma amostra positiva significa apenas que houve um contato prévio entre o hospedeiro e o parasito, além de uma alta titulação não possuir correlação com a severidade dos sinais clínicos observados (Dubey, 2022).

Dentre as metodologias disponíveis para o diagnóstico em animais silvestres, evidenciam-se o Teste de Aglutinação Modificado (MAT), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Hemaglutinação Indireta (HI), Teste de Aglutinação em Látex e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).

Em comparação com MAT, ELISA e RIFI são mais rápidos e menos trabalhosos, porém, necessitam, obrigatoriamente de equipamentos e reagentes como leitor de microplacas, microscópio de fluorescência e conjugados espécie-específicos que não estão disponíveis comercialmente para testes em animais silvestres (Sharma *et al.*, 2019).

O MAT é o teste mais amplamente utilizado para o diagnóstico nos animais silvestres em virtude de sua alta sensibilidade e especificidade, facilidade de execução por não necessitar de equipamentos e conjugados espécie-específicos, além do baixo custo (Dubey; Desmonts, 1987; Su; Dubey, 2020; Dubey, 2022). Embora não tenha sido validado para a detecção de anticorpos em animais marinhos, tem sido frequentemente utilizado para tal.

Para esses testes, o soro sanguíneo é a amostra de eleição. Contudo, nem sempre é possível a colheita de amostras de soro viáveis de animais selvagens vivos ou suas carcaças. Assim, a detecção de anticorpos pode ser realizada em amostras substitutas, como plasma, sangue total, fluido cavitário, ou exsudato cárneo (*meat juice*), não sofrendo interferências pelo processo de hemólise (Bachand *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2019).

Em estudo que avaliou a presença de anticorpos contra *T. gondii* (MAT e ELISA) em exsudato colhido do coração e diafragma de carcaças ovinas em abatedouro e, comparando com o bioensaio em camundongos, foi observada correlação significativa entre altas titulações no MAT e a probabilidade de isolamento a partir de amostras do coração (Villena *et al.*, 2012). Em títulos acima de 1:16, foi possível isolar *T. gondii* em 65% dos casos. Abaixo disso, o isolamento apresentou falhas em 95% dos casos, sugerindo que o fluido colhido de amostras do coração pode ser utilizado para a triagem e seleção de animais que terão amostras colhidas para o bioensaio (Villena *et al.*, 2012).

Segundo Marciano (2013), o diagnóstico a partir de amostras de exsudato cárneo desempenha um importante papel para o monitoramento de *T. gondii*, influenciando diretamente na prevenção da infecção em seres humanos.

A fim de determinar a concordância entre a titulação de anticorpos em amostras de soro e exsudato cárneo, Wallander et al (2015) utilizaram suínos infectados experimentalmente com *T. gondii* como modelo e observaram que todos os infectados testaram positivo nas diferentes amostras de exsudato (coração, diafragma e músculo esquelético), assim como o grupo controle permaneceu negativo. Também foi observada maior correlação entre os anticorpos detectados

no soro e exsudato do coração, sugerindo que a titulação a partir do “exsudato cárneo (*meat juice*) depende do tipo de músculo escolhido para a análise.

Gazzonis et al (2020) avaliaram o exsudato cárneo colhido de amostras de coração ou diafragma de ovinos e caprinos pelo MAT, utilizando 1:2 como ponto de corte. De um total de 278 animais, foram detectados anticorpos contra *T. gondii* em 79 (28,4%) deles. Desses, 18 (22,8%) testaram positivo na técnica de nested-PCR. A redução do número de animais positivos no diagnóstico molecular pode ser justificada em virtude da distribuição não uniforme dos cistos nos tecidos dos hospedeiros associada a uma pequena quantidade de amostra processada em relação ao tamanho do hospedeiro.

2.2.2 Isolamento do agente

O isolamento de *T. gondii* pode ser feito *in vitro*, por meio do cultivo celular ou pelo bioensaio em camundongos. O último sendo considerado o protocolo padrão adotado mundialmente com a finalidade de caracterização de cepas e avaliação da virulência, devido à susceptibilidade da espécie ao parasito e facilidade de manejo (Dubey, 2022).

A técnica é baseada na maceração e digestão péptica do tecido (para liberar os bradizoítos presentes nos cistos teciduais) em que se busca detectar o parasito, com posterior inoculação em camundongos, os quais serão avaliados diariamente quanto à manifestação de sinais clínicos sugestivos da toxoplasmose na espécie, como pelagem arrepiada, apatia, ascite, letargia, secreção ocular, pneumonia, encefalite, entre outros (Su; Dubey, 2020; Dubey, 2022).

No entanto, a quantidade de cistos inoculados durante o processo é desconhecida, principalmente pelo fato de que o número de cistos de *T. gondii* nos tecidos animais pode ser pequeno e nem sempre distribuído uniformemente. Em média, a distribuição é de um cisto a cada 25-250 g de tecido (DUBEY *et al.*, 2012; Dubey, 2022).

Dessa forma, o isolamento por meio do bioensaio em camundongos é parte essencial para o diagnóstico e caracterização molecular do parasito, tornando bastante difícil a obtenção da genotipagem completa sem o seu uso (Cunha *et al.*, 2016), uma vez que o bioensaio também funciona como um amplificador da infecção, obtendo-se assim DNA em quantidade e necessária para uma efetiva genotipagem (Su; Dubey, 2020; Dubey, 2022).

2.2.3 Caracterização molecular

Os estudos de diagnóstico e caracterização molecular de *T. gondii* estão relacionados à técnica de polimorfismo de comprimentos de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (PCR – RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Wendte; Gibson; Grigg, 2011).

Essa técnica é considerada de alta resolução, semelhante ao sequenciamento, além de possibilitar a diferenciação entre alelos atípicos e identificação de eventuais combinações entre alelos de arquétipos distintos (Su; Zhang; Dubey, 2006).

Há um crescente interesse na caracterização da diversidade genética do parasito e, em estudos epidemiológicos, faz-se necessária a análise dos isolados individualmente, de forma a estabelecer a fonte de infecção (Ajzenberg *et al.*, 2002; SU *et al.*, 2010).

Os dados dos genótipos obtidos por meio de RFLP são disponibilizados como referência na plataforma online ToxoDB (<http://toxodb.org>), importante banco de dados na área. O uso da técnica em estudos futuros relacionados à epidemiologia molecular e populações estimula a construção de um banco de dados que torna possível o entendimento acerca da dinâmica de transmissão de *T. gondii* (SU *et al.*, 2010).

2.3 *Toxoplasma gondii* EM ANIMAIS MARINHOS

A presença de *T. gondii* em animais marinhos é intrigante por uma série de fatores. Os felídeos são os únicos hospedeiros definitivos capazes de eliminar nas fezes uma alta quantidade de oocistos extremamente resistentes no ambiente. No entanto, o período de eliminação é curto e a pesquisa por oocistos nos mais distintos ambientes é difícil, especialmente pelas técnicas diagnósticas não realizarem a diferenciação entre os que estão viáveis ou não. Ainda, a maior parte desses animais marinhos têm como base da alimentação outros animais aquáticos de “sangue-frio”, nos quais o parasito não consegue realizar sua multiplicação, sugerindo que a infecção em animais marinhos pode ser originada da contaminação do ambiente marinho por oocistos, além de servir, inclusive, como indicador de contaminação ambiental (Conrad *et al.*, 2005; Dubey, *et al.*, 2020; Dubey, 2022).

Acredita-se que em águas costeiras os oocistos possam chegar por meio do escoamento de áreas agrícolas e efluentes de esgoto (Fayer; Dubey; Lindsay, 2004). Para realizar a infecção, os oocistos precisam realizar o processo de esporulação, que ocorre no ambiente. Em água do mar artificial, com salinidades de 15 e 32 partes por trilhão (ppt), a taxa de esporulação de oocistos foi de 67-76% no período de três dias e infectantes aos camundongos após inoculação via oral. Os oocistos esporulados sobreviveram por pelo menos seis meses (Lindsay *et al.*,

2003). Em água do mar artificial com 15 ppt de salinidade, os oocistos de *T. gondii* sobreviveram por até 24 meses, sendo infectantes aos camundongos pelo mesmo período quando armazenados a 4°C, enquanto os mantidos em temperatura ambiente mantiveram a infectividade entre o 15° e 18° mês (Lindsay; Dubey, 2009). Sua característica hidrofílica associada à água salgada, que torna a carga de superfície do oocisto neutra, facilita a aderência às partículas. Essa propriedade desempenha um papel determinante na ocorrência de retenção ou bioacumulação de oocistos em invertebrados (SHAPIRO *et al.*, 2009; VANWORMER *et al.*, 2016).

Bigot-Clivot *et al.* (2016) avaliaram a exposição de crustáceos (*Gammarus fossarum*) a diferentes concentrações de oocistos de *T. gondii* (200, 2.000 e 20.000 oocistos/gamarídeo/dia) durante 21 dias e, posteriormente, depuração por cinco dias. A partir do 14° dia de exposição, foi detectado DNA do parasito em gamarídeos expostos a todas as concentrações e após o período de depuração.

De moluscos bivalves, Esmerine, Gennari e Pena (2010) analisaram ostras e mexilhões comercializados no município de Santos, SP, Brasil, dos quais dois grupos de ostras (2/60) foram positivas na nested-PCR. Ainda no Brasil, em *pools* de ostras produzidas no estado do Maranhão, Silva *et al.* (2020) também detectaram *T. gondii* por meio da nested-PCR (2/80 *pool*). Na China, pela PCR, a partir de tecidos do trato gastrointestinal de peixes, crustáceos e moluscos comercializados, Zhang *et al.* (2014) detectaram amostras positivas para *T. gondii* em 2.5% (4/160) da espécie *Procambarus clarkii* (Lagostim-vermelho), em 0.8% (1/122) de *Hypophthalmichthys molitrix* (Carpa prateada) e em 0.6% (1/165) de *Macrobrachium nipponense* (Camarão oriental).

A temperatura parece ser um fator limitante para que não ocorra a multiplicação dos parasitos nos animais pecilotérmicos. Yang *et al.* (2020) demonstraram, em estudo *in vitro*, que houve invasão e multiplicação de *T. gondii* em células de peixes nas temperaturas de 30°C, 32°C e 35°C, enquanto em 27°C a invasão e multiplicação foi inibida. Ainda não há evidências suficientes que comprovem a multiplicação do parasito no tecido de peixes em ambientes naturais. No entanto, Massie *et al.* (2010), em estudo experimental, expuseram duas espécies de peixes migratórios e de hábitos filtradores, *Engraulis mordax* (anchovas) e *Sardinops sagax* (sardinhas), a diferentes concentrações de oocistos de *T. gondii*. Os peixes foram eutanasiados após duas (sardinhas e anchovas) e seis a oito horas (apenas anchovas) de exposição para colheita e análise do trato gastrointestinal. Setenta e cinco por cento das anchovas e 60% das sardinhas foram positivas pela técnica de PCR duas horas após a exposição. De seis a oito horas após, 50% das anchovas foram positivas. Os peixes expostos a altas concentrações de oocistos

(100.000 oocistos/L) foram utilizados para alimentação dos camundongos em bioensaio, dos quais 30% manifestaram sinais clínicos compatíveis com a toxoplasmose e testaram positivo para o gene B1 (PCR). Foi sugerido que os peixes migratórios de hábitos filtradores possam atuar como vetores mecânicos, contribuindo para a expansão do parasito no ambiente marinho.

Marino *et al.* (2019) analisaram amostras de brânquias, intestino e pele/músculo de 1.293 peixes de 17 espécies distintas comercializadas para consumo humano em Sicília, Itália. Os animais foram separados em grupos de três, cinco, seis, oito ou 10 unidades de acordo com tamanho e peso. No geral, dos 147 grupos formados, 21.8% foram positivos na qPCR, das quais 12 de 17 espécies testaram positivas, sendo a espécie *Boops boops* (Boga-boga) com maior número de amostras positivas, evidenciando o risco de infecção por meio do consumo, principalmente ao ser humano. No Brasil, também ocorrem espécies da mesma família, Sparidae, ainda não analisadas para esse fim (Devlin; Nagahama, 2002).

Os estudos de soroprevalência têm sido os mais utilizados em aves e mamíferos marinhos, evidenciando uma ampla distribuição de *T. gondii* nessas espécies nas Américas, Europa e Ásia (Alvarado-Esquivel; Sánchez-Okrucky; Dubey, 2012) (Tabelas 1 e 2).

Poucos dados estão disponíveis na literatura acerca do isolamento e genotipagem de *T. gondii* parasitando espécies de aves e mamíferos marinhos, presentes na Tabela 3. Isso se dá pela dificuldade na obtenção de amostras viáveis, livres de autólise, visto que o tempo máximo entre a coleta da amostra e o processamento para o bioensaio é de uma semana, desde que os tecidos sejam mantidos sob refrigeração a 4°C (Gibson *et al.*, 2011; Dubey, Jitender P. *et al.*, 2020; Su; Dubey, 2020).

Diversos casos de toxoplasmose clínica nesses animais já foram relatados e a enfermidade tem sido considerada uma das doenças emergentes mais importantes, podendo ocasionar a morte e encalhe desses animais (van Bresse *et al.*, 2009; Gonzales-Viera *et al.*, 2013; Bigal *et al.*, 2018; Costa-Silva *et al.*, 2019). Alguns casos estão sumarizados na Tabela 4.

Ainda há diversas lacunas a serem preenchidas em relação ao ciclo do parasito no ambiente marinho e as formas em que esses animais, muitos deles ocupando diferentes nichos, são expostos (Acosta *et al.*, 2019; Costa-Silva *et al.*, 2019; Dubey, Jitender P. *et al.*, 2020).

Assim, estudos da infecção por *T. gondii* em aves e mamíferos marinhos, no litoral Sul de Santa Catarina, para determinar a prevalência, isolar o agente e caracterizar os genótipos circulantes do parasito irão contribuir para a epidemiologia da toxoplasmose nessas espécies animais.

Tabela 1 - Pesquisa de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em aves marinhas ao redor do mundo

Nome popular (Espécie)	Origem	N	Positivos (%)	Teste	Cutoff	Referência
Cormorão-das-galápagos (<i>Phalacrocorax harrisi</i>)	Equador (Galápagos)	258	6 (2,3)	MAT ¹	1:50	(Deem <i>et al.</i> , 2010)
<i>Larus ribundus</i> (Guincho-comum)	Itália	18	4 (22,2)	RIFI ²	1:20	(Nardoni <i>et al.</i> , 2019)
<i>Larus michahellis</i> (Gaivota-de-patas-amarelas)	Espanha	479	109 (22,8)	MAT	1:25	(Cabezón <i>et al.</i> , 2016)
<i>Larus hyperboreus</i> (Gaivota-hiperbórea)	Noruega	27	0 (0)	DAT ³	1:40	(Prestrud <i>et al.</i> , 2007)
Pinguim-das-Galápagos (<i>Spheniscus mendiculus</i>)	Equador (Galápagos)	298	7 (2,3)	MAT	1:50	(Deem <i>et al.</i> , 2010)
Pinguim-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	Brasil	100	28 (28)	MAT	1:20	(Gennari <i>et al.</i> , 2016b)
Pinguim-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	Chile	132	57 (43,2)	MAT	1:20	(Acosta <i>et al.</i> , 2019)
Pinguim-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	Brasil	145	18 (12,4)	MAT	1:20	(Acosta <i>et al.</i> , 2019)
Pinguim-de-Humboldt (<i>Spheniscus humboldti</i>)	República Tcheca	4	2 (50)	LAT ⁴	NA	(Bártová <i>et al.</i> , 2018)
Atobá-grande (<i>Sula dactylatra</i>)	Brasil	23	8 (34,8)	MAT	1:5	(Gennari <i>et al.</i> , 2016a)
Atobá-pardo (<i>Sula leucogaster</i>)	Brasil	19	9 (47,4)	MAT	1:5	(Gennari <i>et al.</i> , 2016a)

¹Teste de Aglutinação Modificado (MAT)²Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)³Teste de Aglutinação Direta (DAT)⁴Teste de Aglutinação em Látex (LAT)

Tabela 2 - Pesquisa de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em mamíferos marinhos ao redor do mundo

Nome popular/Espécie	Origem	N° analisado	N° positivo (%)	Teste	Cutoff	Referência
Golfinho-nariz-de-garrafa-comum (<i>Tursiops truncatus truncatus</i>)	Canadá	8	8 (100)	MAT	1:25	(Dubey <i>et al.</i> , 2009)
Golfinho-nariz-de-garrafa-comum (<i>Tursiops truncatus truncatus</i>)	Europa	6	3 (50)	MAT	1:40	(van de Velde <i>et al.</i> , 2016)
Golfinho-nariz-de-garrafa-comum (<i>Tursiops truncatus truncatus</i>)	Itália	4	3 (75)	RIFI	1:40	(Profeta <i>et al.</i> , 2015)
Golfinho-nariz-de-garrafa-comum (<i>Tursiops truncatus truncatus</i>)	Itália	8	2 (25)	MAT	1:10	(Pretti <i>et al.</i> , 2010)
Golfinho-nariz-de-garrafa-comum (<i>Tursiops truncatus truncatus</i>)	Itália	10	1 (10)	MAT	1:20	(Terracciano <i>et al.</i> , 2020)
Golfinho-nariz-de-garrafa-comum (<i>Tursiops truncatus truncatus</i>)	México	63	55 (87,3)	MAT	1:25	(Alvarado-Esquivel; Sánchez-Okrucky; Dubey, 2012)

Golfinho-nariz-de-garrafa-comum (<i>Tursiops truncatus truncatus</i>)	EUA - Flórida	86	8 (9,3)	HAI	1:64	(Bernal-Guadarrama <i>et al.</i> , 2014)
	EUA - Carolina do Sul	79	12 (15,2)	HAI	1:64	(Schaefer <i>et al.</i> , 2009)
Golfinho-nariz-de-garrafa-do-mar-negro (<i>Tursiops truncatus ponticus</i>)	Filipinas	7	1 (14,3)	LAT		(Obusan <i>et al.</i> , 2019)
Golfinho-estriado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	Europa	9	4 (44,4)	MAT	1:40	(van de Velde <i>et al.</i> , 2016)
Golfinho-estriado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	Itália	27	11 (40,7)	RIFI	1:40	(Profeta <i>et al.</i> , 2015)
Golfinho-estriado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	Itália	8	4 (50)	RIFI	1:40	(Di Guardo <i>et al.</i> , 2010)
Golfinho-estriado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	Itália	16	1 (6,3)	MAT	1:10	(Pretti <i>et al.</i> , 2010)
Golfinho-estriado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	Itália	15	5 (33,3)	MAT	1:20	(Terracciano <i>et al.</i> , 2020)
Leão-marinho-da-Califórnia (<i>Zalophus californianus</i>)	México	4	2 (50)	MAT	1:25	(Alvarado-Esquivel; Sánchez-Okrucky; Dubey, 2012)
Leão-marinho-da-Califórnia (<i>Zalophus californianus</i>)	EUA - Califórnia	1630	536 (32,9)	RIFI	1:40	(Carlson-Bremer <i>et al.</i> , 2015)

Lobo-marinho-antártico (<i>Arctocephalus gazella</i>)	Antártica	21	12 (57,1)	MAT	1:40	(Jensen <i>et al.</i> , 2012)
Lobo-marinho-antártico (<i>Arctocephalus gazella</i>)	Antártica	165	4 (2,4)	MAT	1:25	(Rengifo-Herrera <i>et al.</i> , 2012)
Elefante-marinho-do-Sul (<i>Mirounga leonina</i>)	Antártica	48	11 (22,9)	MAT	1:40	(JENSEN <i>et al.</i> , 2012)
Elefante-marinho-do-Sul (<i>Mirounga leonina</i>)	Antártica	13	10 (76,9)	MAT	1:25	(Rengifo-Herrera <i>et al.</i> , 2012)

Tabela 3 - Detecção e caracterização molecular de *Toxoplasma gondii* em aves e mamíferos marinhos ao redor do mundo

Nome popular (Nome científico)	Origem	Nº analisado	Nº positivo (%)	Teste	Genótipo	Referência
Aves						
Guincho-comum (<i>Larus ridibundus</i>)	Itália	18	4 (22,2%)	PCR	NI	(Nardoni <i>et al.</i> , 2019)
Gaivota-de-patas-amarelas (<i>Larus michahellis</i>)	Turquia	1	1 (100%)	Bioensaio + PCR	Tipo II	(Karakavuk <i>et al.</i> , 2018)
Gaivota-de-patas-amarelas (<i>Larus michahellis</i>)	Turquia	1	1 (100%)	Bioensaio + PCR	Tipo III	(Karakavuk <i>et al.</i> , 2018)
Corvo-marinho-de-faces-brancas (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	Turquia	1	1(100%)	PCR	NI	(Karakavuk <i>et al.</i> , 2018)

Pernilongo (<i>Himantopus himantopus</i>)	Iraque	NI	1 (100%)	PCR + Sequenciamento e diagnóstico molecular direto	NI	(Al-Aredhi; Al-Mayali, 2020)
Pardela-sombria (<i>Puffinus puffinus</i>)	Brasil	2	0 (0%)	Isolamento e diagnóstico molecular direto	NI	(Silva <i>et al.</i> , 2018)
Tipo II, ToxoDB						
Gaivota-de-patas-amarelas (<i>Larus michahellis</i>)	Turquia	2	2 (100%)	Isolamento e RFLP	#1 ou #3 (1, TgBirdTr_Izmir2); ToxoDB #2 (1, TgBirdTr_Izmir3)	(Karakavuk <i>et al.</i> , 2018)
Corvo-marinho-de-faces-brancas (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	Turquia	1	1 (100%)	Isolamento e RFLP	NI	(Karakavuk <i>et al.</i> , 2018)
Gaivotão (<i>Larus dominicanus</i>)	Brasil	21	5 (23,8%)	PCR + sequenciamento	NI	(Sato <i>et al.</i> , 2024)
Pardela-sombria (<i>Puffinus puffinus</i>)	Brasil	8	2 (25%)	PCR + sequenciamento	NI	(Sato <i>et al.</i> , 2024)
Mamíferos						
Golfinho-nariz-de-garrafa (<i>Tursiops truncatus</i>)	Canadá	1	1 (100%)	Bioensaio + RFLP	TgDoCA1	(Dubey <i>et al.</i> , 2009)
Leão-marinho-da-Califórnia (<i>Zalophus californianus</i>)	EUA	1	1 (100%)	Bioensaio + RFLP	NI	(Carlson- Bremer <i>et al.</i> , 2015)

Tabela 4 - Achados anatomopatológicos em estudo com *Toxoplasma gondii* em aves e mamíferos marinhos

Nome popular/Espécie	Origem	Nº analisado	Achados principais	Diagnóstico	Referência
Aves					
Pinguim-africano (<i>Spheniscus demersus</i>)	Países Baixos	3	Hepatite, pneumonia, encefalite e taquizoítos	IHQ ¹ e MET ²	(Ploeg; Ultee; Kik, 2011)
Pinguim-de-Humboldt (<i>Spheniscus humboldti</i>)	EUA	4	Lesões no fígado e baço; pulmões, fígado e baço; coração, pulmões, fígado e baço; pulmões, fígado e baço	Histopatologia	(Ratcliffe; Worth, 1950)
Pinguim-africano (<i>Spheniscus demersus</i>)	EUA	1	Lesões nos pulmões, fígado e baço	Histopatologia	(Ratcliffe; Worth, 1950)
Pinguim-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	EUA	2	Lesões nos pulmões e fígado em um; lesões nos pulmões, fígado e baço	Histopatologia	(Ratcliffe; Worth, 1950)
Mamíferos					
Golfinho-nariz-de-garrafa (<i>Tursiops truncatus</i>)	Brasil	1	Hepatite e cistos teciduais	IHQ	(Costa-Silva <i>et al.</i> , 2019)
Golfinho-nariz-de-garrafa (<i>Tursiops truncatus</i>)	Canadá	2	Encefalite e cistos teciduais	IHQ. Isolamento em um e PCR positivo em outro (Tipo II)	(Dubey <i>et al.</i> , 2009)
Golfinho-nariz-de-garrafa (<i>Tursiops truncatus</i>)	Israel	3	Lesões e <i>T. gondii</i> presente em fragmentos de pulmão e adrenal	Todos PCR positivos. IHQ em um	(Bigal <i>et al.</i> , 2018)

Boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>)	Brasil	1	Pneumonia intersticial, arterite, adrenalite, hepatite e taquizoítos	IHQ e MET	(Gonzales-Viera <i>et al.</i> , 2013; Costa-Silva <i>et al.</i> , 2019)
Golfinho-estriado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	Itália	3	Meningoencefalite. Cistos teciduais em encéfalo de dois	Todos PCR positivos. IHQ em dois (Tipo II)	(Di Guardo <i>et al.</i> , 2010; Traversa <i>et al.</i> , 2010; Di Guardo <i>et al.</i> , 2011)
Golfinho-estriado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	Itália	1	Meningoencefalite	IHQ e PCR	(Grattarola <i>et al.</i> , 2016)
Leão-marinho-da-Califórnia (<i>Zalophus californianus</i>)	EUA	12	3 fetos abortados. Lesões no cérebro, coração, nódulos linfáticos, músculo esquelético, urinário, pâncreas, baço. Lesões neurológicas em 11	IHQ positivo em sete; Isolamento em um; Anticorpos em seis	(Carlson-Bremer <i>et al.</i> , 2015)
Lobo-marinho-do-Sul (<i>Arctocephalus australis</i>)	Brasil	1	Meningoencefalite e miocardite, presença de cistos teciduais	IHQ e PCR	(Reisfeld <i>et al.</i> , 2019)

¹IHQ: imunohistoquímica; ²MET: microscopia eletrônica de transmissão

3 HIPÓTESES

Há uma maior diversidade genética de *Toxoplasma gondii* nas Américas Central e do Sul e o ciclo silvestre pode favorecer o desenvolvimento de novos genótipos.

Animais marinhos são infectados por *T. gondii* e apresentam propriedades moleculares cuja caracterização evidenciará a diversidade de genótipos descritos no Brasil.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Contribuir para o entendimento da epidemiologia do *Toxoplasma gondii* em aves e mamíferos marinhos no litoral Sul de Santa Catarina.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* em amostras de exsudato cárneo de aves e mamíferos marinhos no litoral Sul de Santa Catarina.

- Isolar cepas de *T. gondii* em aves e mamíferos marinhos.

- Caracterizar os isolados de *T. gondii* obtidos dos tecidos de aves e mamíferos marinhos.

5 METODOLOGIA

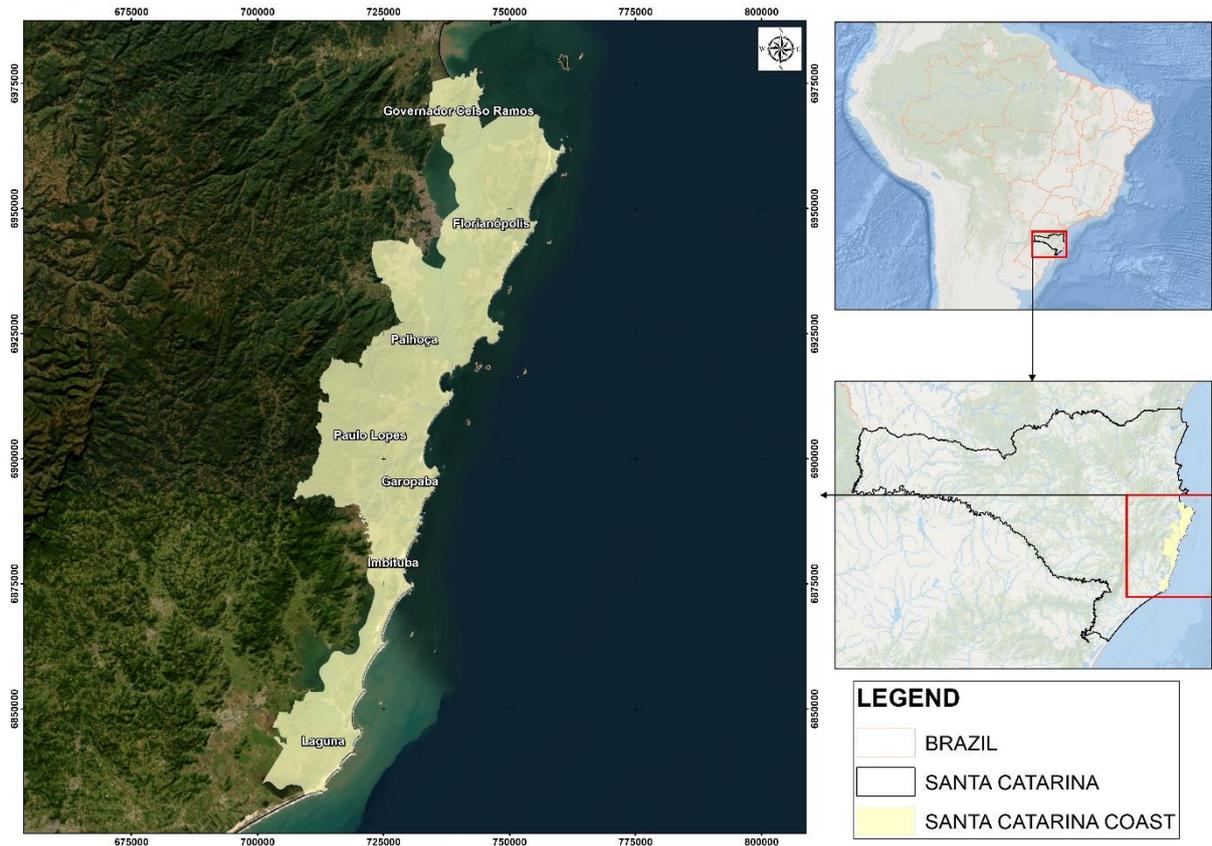
5.1 ÁREA DE ESTUDO, AMOSTRAGEM E SELEÇÃO DOS ANIMAIS

5.1.1 Área de estudo

O Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) realiza as atividades de monitoramento, reabilitação, recolhimento e necropsia da fauna marinha do litoral de Santa Catarina ao Rio de Janeiro, contando com várias unidades de estabilização e reabilitação em locais estratégicos. A Unidade de Estabilização da Fauna Marinha da UDESC-CERES é responsável pelo monitoramento do Trecho 1, composto pela costa compreendida entre os municípios de Laguna a Imbituba (28°8'37.558" S 48°38'42.367" W e 28°29'48.831" S 48°45'41.561" W). Além disso, também realiza necropsias dos animais recolhidos pelo

Trecho 2, que corresponde a área entre os municípios de Imbituba e Governador Celso Ramos (27°22'4.312" S 48°32'28.594" W e 28°8'14.961" S 48°38'30.046" W) (Figura 1).

Figura 1 - Localização da área de estudo e de atuação da Unidade de estabilização da fauna marinha da UDESC-CERES, Santa Catarina, Brasil.



Fonte: elaborado pela autora (2024)

5.1.2 Amostragem e seleção dos animais

As amostras necessárias para a execução do presente projeto foram cedidas pela Unidade de Estabilização da Fauna Marinha da UDESC-CERES e encaminhadas semanalmente ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC).

Dos animais que vieram a óbito na unidade de estabilização ou foram recolhidos sem vida na costa, foi realizada a necropsia conforme a técnica já utilizada na unidade e, apenas as carcaças correspondentes aos códigos 2 e 3 (Tabela 5) foram utilizadas no estudo. Fragmentos de cérebro, coração, fígado, pulmões e musculatura esquelética foram coletados e armazenados a 4°C para posterior processamento.

Tabela 5 - Classificação das carcaças de animais marinhos de acordo com os códigos e características

Código	Descrição	Características
1	Animal vivo	-
2	Carcaça fresca	Aparência normal e poucos danos. Olhos e mucosas brilhantes, inchaço ou odor da carcaça ausente, vísceras intactas e olhos íntegros
3	Pouca decomposição	Carcaça intacta, mas inchaço evidente. Olhos e mucosas secos, odor moderado, alteração de coloração de órgãos por embebição hemoglobínica, vísceras ainda intactas e de consistência normal, intestino dilatado pela presença de gás. É possível observar em alguns casos a necrofagia dos olhos e tecidos moles.
4	Avançada decomposição	A carcaça pode estar intacta, no entanto, colapsada. Perda da epiderme, forte odor, ossos destacados e vísceras podem ser recolhidas, mas liquefeitas frequentemente, grande quantidade de gás em intestino.

Adaptado de Geraci e Lounsbury (2005) e Petrobras (2019).

5.2 ISOLAMENTO DE *Toxoplasma gondii*

5.2.1 Digestão péptica dos tecidos

Os tecidos coletados dos animais foram pesados e triturados na forma de *pool* (que variou de 10 a 50 gramas, dependendo do tamanho dos animais), para a realização do bioensaio por animal e não por órgão, com o objetivo de reduzir o número de camundongos a serem utilizados no estudo.

A técnica de digestão enzimática de tecidos foi realizada de acordo com Dubey (1998). O *pool* de tecidos foi triturado, com o auxílio de um mixer, com solução salina 0,85%. A esse material, adicionou-se uma solução digestiva artificial (pepsina 1:10000; NaCl; HCl 37% e água destilada q.s.p), incubada em estufa sob agitação a 37°C por 60 minutos.

Após a incubação, o material foi filtrado através de duas camadas de gaze e centrifugado a 1200 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento neutralizado em solução de bicarbonato de sódio 1,2% (pH 8,3). Ressuspendeu-se a solução em solução salina 0,85% e centrifugada sob as mesmas condições. Novamente, desprezou-se o sobrenadante, e o sedimento foi homogeneizado com salina contendo 1000U de penicilina e 100µg de estreptomicina/mL. 1 mL do produto da digestão péptica foi inoculado via subcutânea em cada camundongo.

5.2.2 Bioensaio em camundongos

Para o bioensaio é recomendada a utilização de três camundongos para cada amostra dos diferentes tecidos por animal (Su; Dubey, 2020). Contudo, foram utilizados apenas três camundongos por *pool* de tecidos/animal marinho, visando a redução do número de camundongos a serem utilizados no experimento, e alinhá-lo com os princípios éticos dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição) (Ryser-Degiorgis, 2013). No período de 2015 a 2019, foi relatado o encalhe de aproximadamente 500 animais marinhos, dentre aves, mamíferos e répteis. Utilizou-se a amostragem por conveniência, que embora não permita inferências

robustas para a população, é um método frequentemente usado em estudos exploratórios, principalmente onde a obtenção de uma amostra aleatória não é possível.

Dessa forma, aplicando a fórmula para o tamanho amostral, dado um nível de confiança e uma margem de erro:

$$n = \frac{Z^2 \cdot p (1 - p)}{E^2}$$

Onde: n = tamanho da amostra

Z = valor Z para o nível de confiança.

p = proporção estimada da população (quando desconhecida, usa-se 0,5 para maximizar a amostra).

E = margem de erro.

Assumindo que quiséssemos detectar uma proporção de 50% ($p = 0.5$) com uma margem de erro de 10% ($E = 0.1$) e um nível de confiança de 95% ($Z = 1.96$), temos que aproximadamente 96 carcaças de animais marinhos seriam necessárias para atingir os critérios estabelecidos. No entanto, utilizamos 90 bioensaios (no total, 270 camundongos), para que fosse possível a execução do projeto dentro das capacidades do laboratório, a fim de garantir que cada bioensaio fosse conduzido com o máximo de controle.

Cada caixa correspondeu a uma amostra de animal marinho e foi composta por três camundongos inoculados. Estes foram ambientados em mini-isoladores em rack ventilado (Ventilife, Alesco®) com alimento e água *ad libitum*, examinados diariamente com o objetivo de identificar manifestações clínicas compatíveis com a toxoplasmose, como letargia, pelos arrepiados, anorexia, sinais neurológicos, entre outros (Su; Dubey, 2020; Dubey, 2022). Em caso de manifestação de sinais clínicos, os animais foram eutanasiados mediante a exposição ao isoflurano para verificar a presença de taquizoítos no líquido peritoneal e em *imprint* do pulmão. Os que sobreviveram até 45 dias pós-inoculação foram eutanasiados pelo mesmo método e avaliados pela técnica de *squash* do cérebro para a pesquisa de cistos teciduais. Todos os soros dos camundongos foram testados para a pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* pela técnica de RIFI com ponto de corte de 1:16.

5.2.3 Pesquisa de *Toxoplasma gondii* em tecidos de camundongos

Foi realizada a necropsia em todos os camundongos utilizados no estudo, com técnicas adequadas para a espécie. Amostras de coração, cérebro e pulmão foram colhidas, transferidas para microtubos e armazenadas a -20°C para biologia molecular.

Para a pesquisa de cistos, os fragmentos de cérebro (de 3 a 5 mm²) foram processados pela técnica de squash, por meio da compressão do tecido entre lâmina e lamínula e analisados em microscopia óptica em 400x.

5.2.4 Sorologia dos camundongos

Para a detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii* foi realizada a técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) descrita por Camargo (1964).

As amostras de soro (e controles positivo e negativo) foram diluídas nos microtubos em tampão fosfato-salino (PBS) e adicionados 12 µL de cada diluição nas lâminas contendo antígenos (taquizoítos de *T. gondii*). A leitura foi realizada em microscópio epifluorescente (Carl Zeiss Microscopy, Alemanha) e foram consideradas positivas somente as amostras que apresentaram fluorescência em toda a superfície do taquizoíto com titulação maior ou igual a 16 (Dubey, 2022). As amostras positivas foram tituladas, em múltiplo de quatro, de 16 a 4096.

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Foi realizada a extração de DNA das amostras de cérebro e do lavado peritoneal dos camundongos, contendo cistos e taquizoítos, respectivamente. As amostras de cérebro foram processadas em gral e pistilo estéreis e homogeneizadas em 1 mL de solução salina estéril. As amostras foram distribuídas em microtubos previamente identificados e armazenadas a -20°C.

A extração foi realizada utilizando kit comercial DNeasy[®] Blood and Tissue, Qiagen, seguindo as recomendações do fabricante.

5.4 ANÁLISE MOLECULAR

5.4.1 PCR 529 pb

Para a detecção de *T. gondii* foi utilizado como alvo o fragmento não codificante de 529 pb, com as sequências dos primers (Tox4 5' CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3' e Tox5 5' CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3') previamente descritos por Homan et

al. (2000). O volume final da reação foi de 25 μ L, contendo 50 mM MgCl₂, 10x Buffer, 10 mM dNTP, 20 pmol/ μ L de cada primer, 5U/ μ L de Taq DNA polimerase e 2 μ L de amostra.

A amplificação seguiu os seguintes parâmetros no termociclador: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, e 72°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBRTM DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) e visualizados sob luz UV.

As amostras positivas foram utilizadas nas reações de PCR-RFLP 18SRNA e PCR-RFLP.

5.4.2 PCR-RFLP 18s rRNA

A triagem dos isolados foi realizada a partir de nested-PCR para a detecção do gene 18s. Por meio desse teste, é possível identificar SNPs que distinguem protozoários do filo apicomplexa muito semelhantes, como *T. gondii*, *Hammondia hammondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. (SU *et al.*, 2010).

Primeiramente, a amplificação da sequência de DNA-alvo foi realizada por PCR-Multiplex a partir dos primers externos (25 μ M) Tg18s48F (5'-CCATGCATGTCTAAGTATAAGC-3') e Tg18s359R (5'-GTTACCCGTCCTACTGCCAC-3'), seguido de nested-PCR com os primers internos (25 μ M) Tg18s58F (5'-CCATGCATGTCTAAGTATAAGC-3').

O produto de n-PCR das amostras positivas foi clivado pelas enzimas de restrição DdeI, Hpy188III e MspI. Para clivagem, as amostras foram incubadas a 37°C por uma hora. As amostras, após o período de incubação, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com SYBRTM DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) e visualizados sob luz UV em fotodocumentador.

5.5 GENOTIPAGEM MULTILOCUS PCR-RFLP

Para a caracterização genotípica dos isolados encontrados foram utilizados os marcadores genéticos presentes na Tabela 6 (Pena *et al.*, 2008; Su; Zhang; Dubey, 2006). A PCR Multiplex foi realizada conforme Su *et al.*, (2010) com volume final de 25 μ L, 2,5 μ L 10x tampão de reação, dNTPs 2,5 mM cada, MgCl₂ 25 mM, 25 μ M de cada primer, 5 U/ μ L Platinum Taq DNA polymerase[®] (Invitrogen), 2 μ L de DNA e água ultrapura autoclavada. Foi

utilizada a seguinte programação: 95°C por 4 minutos, 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos.

A reação nested-PCR foi realizada para cada marcador conforme a reação anterior, e os parâmetros do termociclador foram: 95°C por 4 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1.5 minutos.

Os produtos obtidos da reação nested-PCR foram clivados por meio da ação de enzimas de restrição de acordo com condições específicas de tempo e temperatura para cada marcador utilizado. Foram adicionados 3 µL do produto de cada reação a 17 µL do mix de digestão (1x CutSmart Buffer, 0.1 µL de cada enzima e água ultrapura autoclavada). A eletroforese foi realizada em gel de agarose 2.5-3% a 80-120V por aproximadamente 1.5 horas. O gel foi fotografado e os resultados obtidos comparados com dados presentes na plataforma ToxoDB (<https://toxodb.org>) para a determinação dos genótipos de *T. gondii* que infectam aves e mamíferos marinhos no litoral Sul de Santa Catarina.

5.6 OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS EM AMOSTRAS DE EXSUDATO CÁRNEO (*JUICE MEAT*)

De 372 amostras de aves marinhas recebidas, foram colhidas amostras de exsudato cárneo ou *juice meat*, das embalagens contendo os tecidos de cada animal. As amostras foram centrifugadas a 1000 g a 4°C por cinco minutos. O sobrenadante de cada amostra foi colhido e utilizado posteriormente para a pesquisa de anticorpos (Sharma *et al.*, 2019).

Para a sorologia foram selecionadas apenas as amostras de aves devido a possibilidade de adoção de conjugado anti-IgY de galinha (Sigma-Aldrich®), espécies similares (aves). A presença de anticorpos foi determinada pela técnica de RIFI, com a diluição do conjugado de 1:200 e ponto de corte de 1:2, conforme utilizado em outros estudos (Ranucci *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2019). As amostras positivas foram tituladas de 2 a 32.

Tabela 6 - Primers para PCR-RFPL multiplex multilocus nested (Mn-PCR-RFPL)

Marcadores	Primers PCR-multiplex (primers externos)	Primers PCR-nested (primers internos)	PCR- nested (pb)	Enzimas de restrição, tampão NEB, tempo e temperatura de incubação
		SAG1-S2:		
	SAG1-Fext: GTTCTAACCACGCACCCTGAG	CAATGTGCACCTG TAGGAAGC SAG1-		
SAG1	SAG1-Rext2: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	Rext: GTGGTTCTCCGTC GGTGTGAG	390	Sau96I + HaeII (digestão dupla) NEB4, BSA, 37°C 1 h. 2.5% gel
5'- SAG2	não necessário	5-SAG2F: GAAATGTTTCAGG TTGCTGC 5- SAG2R: GCAAGAGCGAAC TTGAACAC	242	MboI, NEB4, BSA, 37°C 1 h. 2.5% gel

			3-SAG2F:		
		3'-SAG2-Fext:	ATTCTCATGCCTC		
3'-		TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC	CGCTTC	3-SAG2R:	222
SAG2		3'-SAG2-Rext:	AACG		HhaI, NEB4, BSA,
		TCAAAGCGTGCATTATCGC	TTTCACGAAGGCA		37°C 1 h. 2.5% gel
			CAC		
			P43S2:		
		SAG3-Fext:	TCTTGTCGGGTGT		
SAG3		CAACTCTCACCATTCCACCC	TCACTCA	P43AS2:	225
		SAG3-Rext:	CACAAGGAGACC		NciI, NEB4, BSA,
		GCGCGTTGTTAGACAAGACA	GAGAAGGA		37°C 1 h. 2.5% gel
			Btub-F:		
		BTUB-Fext:	GAGGTCATCTCGG		
BTUB		TCCAAAATGAGAGAAATCGT	ACGAACA	BtubR:	411
		BTUB-Rext:	TTGTAGGAACACC		BsiEI + TaqI
		AAATTGAAATGACGGAAGAA	CGGACGC		(digestão dupla), NEB4,
			GRA6-F1:		BSA, 60°C 1 h. 2.5% gel
		GRA6-Fext:	TTCCGAGCAGGT		
GRA6		ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT	GACCT	GRA6-R1x:	344
		GRA6-Rext:	TCGCCGAAGAG		MseI, NEB2, BSA,
		GCACCTTCGCTTGTGGTT	TTGACATAG		37°C 1 h. 2.5% gel
					Observação: usar 0.2 µl/rxn
					of MseI

			C22-8F:			BsmAI (or BCoDI)
	c22-8-Fext:		TCTCTCTACGTGG			+ MboII (digestão dupla),
c22-8	TGATGCATCCATGCGTTTAT	c22-8-Rext:	ACGCC	C22-8R:	521	NEB2, BSA, 37°C 30 min,
	CCTCCACTTCTTCGGTCTCA		AGGTGCTTGGATA			55°C 30 min. 2.5% gel
			TTCGC			
			C29-2F:			HpyCH4IV + RsaI
	c29-2-Fext:		AGTTCTGCAGAGT			(digestão dupla), NEB1,
c29-2	ACCCACTGAGCGAAAAGAAA	c29-2-Rext:	GTCGC	C29-2R:	446	BSA, 37°C 1 h. 2.5% gel.
	AGGGTCTCTTGCGCATACAT		TGTCTAGGAAAGA			Observação: deve usar 0.2
			GGCGC			µl/rxn de ambas as enzimas
			L358-F2:			HaeIII + NlaIII
	L358-Fext:		AGGAGGCGTAGC			(digestão dupla), NEB4,
L358	TCTCTCGACTTCGCCTCTTC	L358-Rext:	GCAAGT	L358-R2:	418	BSA, 37°C 1 h. 2.5% gel.
	GCAATTCCTCGAAGACAGG		CCCTCTGGCTGCA			Observação: usar 0.2 µl/rxn
			GTGCT			of NlaIII
			PK1-F:			AvaI + RsaI
	PK1-Fext:		CGCAAAGGGAGA			(digestão dupla), NEB4,
PK1	GAAAGCTGTCCACCCTGAAA	PK1-Rext:	CAATCAGT	PK1-R:	903	BSA, 37°C 1 h. 2.5% gel
	AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT		TCATCGCTGAATC			
			TCATTGC			

		SAG2-Fa:		
		ACCCATCTGCGAA		
	Alt. SAG2-Fext:	GAAAACG SAG2-	546	HinI + TaqI,
Alt.	GGAACGCGAACAATGAGTTT Alt. SAG2-			NEB3, BSA, 37°C 30 min,
SAG2	Rext: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	Ra:		65°C 30 min. 2.5% gel
		ATTTCGACCAGCG		
		GGAGCAC		
		Apico-F:		
		TGCAAATTCTTGA		AflIII + DdeI
	Apico-Fext:	ATTC TCAGTT	640	(digestão dupla), NEB2,
Apico	TGGTTTTAACCTAGATTGTGG Apico -Rext:	Apico-R:		BSA, 37°C 1 h. 3% gel.
	AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	GGGATTCGAACCC		Observação: deve usar 0.2
		TTGATA		µl/rxn de ambas as enzimas

5.7 COMISSÃO DE ÉTICA

A utilização e/ou transporte de amostras de animais marinhos provenientes do PMP-BS foi aprovada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - Ministério do Meio Ambiente - ABIO 640/2015 (Apêndice A)

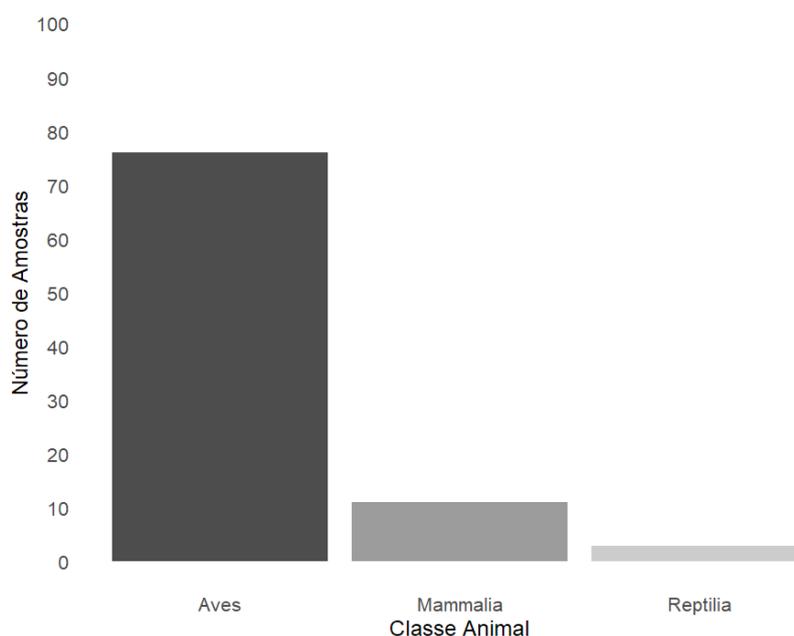
O presente projeto foi submetido à análise e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC) sendo aprovado sob o protocolo nº 9958171021 no dia 22 de outubro de 2021 (Apêndice B).

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para o isolamento de *T. gondii*, foram utilizadas 90 amostras de animais marinhos, que correspondeu a 90 bioensaios. Dessas, 84,45% (76/90) pertenciam à classe Aves, 12,22% (11/90) à classe Mammalia e 3,33% (3/90) à classe Reptilia, conforme a Figura 2. A classificação e as espécies analisadas estão descritas na Tabela 7.

Figura 2 - Número de amostras de animais marinhos por classe animal.



Fonte: elaborado pela autora (2024)

Tabela 7 - Número de amostras analisadas por classificação taxonômica, idade e gênero.

	Nº de animais	Idade	Gênero
Aves			
Ordem Charadriiformes			
Família Laridae			
	10	Adulto	Fêmea
	9	Adulto	Macho
<i>Larus dominicanus</i> (Gaivotão)	3	Juvenil	Fêmea
	3	Juvenil	Macho
	1	Indeterminado	Macho
<i>Sterna hirundo</i> (Trinta-réis-boreal)	2	Juvenil	Macho
Ordem Procellariiformes			
Família Procellariidae			
<i>Macronectes giganteus</i> (Petrel-gigante-do-Sul)	1	Juvenil	Fêmea
<i>Procellaria aequinoctialis</i> (Pardela-preta)	1	Adulto	Fêmea
	1	Juvenil	Fêmea
<i>Pachyptila vittata</i> (Faigão-de-bico-largo)	1	Adulto	Fêmea
<i>Puffinus puffinus</i> (Pardela-sombria)	2	Juvenil	Fêmea
Ordem Suliformes			
Família Phalacrocoracidae			
<i>Phalacrocorax brasilianus</i> (Biguá)	2	Juvenil	Fêmea
	3	Juvenil	Macho
Família Sulidae			
<i>Sula leucogaster</i> (Atobá-pardo)	1	Adulto	Fêmea
	1	Juvenil	Fêmea
Ordem Sphenisciformes			
Família Spheniscidae			
	21	Juvenil	Fêmea
<i>Spheniscus magellanicus</i> (Pinguim-de-Magalhães)	1	Adulto	Macho
	12	Juvenil	Macho
	1	NI	NI
Mammalia			
Ordem Carnivora			
Família Otariidae			
<i>Arctocephalus australis</i> (Lobo-marinho-Sul-americano)	3	Juvenil	Fêmea
	1	Juvenil	Macho
Ordem Cetacea			
Família Iniidae			
	1	Adulto	Fêmea
<i>Pontoporia blainvillei</i> (Toninha)	2	Juvenil	Fêmea
	2	Juvenil	Macho
	1	Filhote	Macho

	1	Juvenil	Indeterminado
Reptilia			
Ordem Testudines			
Família Cheloniidae			
<i>Chelonia mydas</i> (Tartaruga-verde)	1	NI	NI
	1	Juvenil	Indeterminado
<i>Caretta caretta</i> (Tartaruga-cabeçuda)	1	Juvenil	Macho

NI: Não Informado

6.2 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

Em 38 dos 90 bioensaios realizados, foi possível detectar *T. gondii*, seja pela presença de cistos, taquizoítos e/ou anticorpos (Figura 3). Dos positivos, 92,1% (35/38) foram amostras de aves, e 7,9% mamíferos (3/38). Os resultados dos bioensaios, por espécie e testes realizados, além da manifestação de sinais clínicos, estão presentes na Tabela 8.

Figura 3 - A: Cisto tecidual de *T. gondii* em sistema nervoso central de camundongo; B: Taquizoíto de *T. gondii* em lavado peritoneal de camundongo.

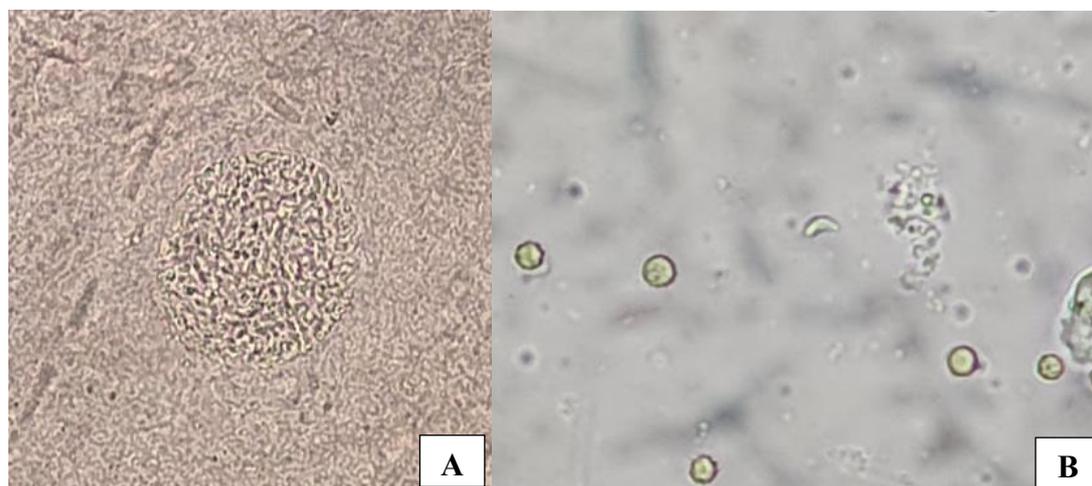


Tabela 8 - Distribuição de bioensaios positivos de acordo com a espécie de animal marinha avaliada, técnica de diagnóstico realizada e manifestação de sinais clínicos

Nome Popular (Nome Científico)	Bioensaios	Camundongos positivos/inocula dos	Óbito de camundon gos (dpi)	Taquizoítos	Cistos teciduais	RIFI	Sinais clínicos	PCR 529pb
-----------------------------------	------------	---	-----------------------------------	-------------	---------------------	------	--------------------	--------------

Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>)	B55	3/3	21	+	-	+	-	+
	B76	1/3	45	-	+	+	-	+
	B83	1/3	45	-	-	+	-	-
Gaivotão (<i>Larus dominicanus</i>)	B08	1/3	45	-	-	+	-	+
	B13	1/3	28	NR	-	+	+	+
	B15	1/3	45	-	-	+	-	+
	B23	3/3	30	+	+	+	+	+
	B42	2/3	39	-	+	+	-	+
	B44	3/3	45	-	+	+	-	+
	B48	3/3	24	+	+	+	+	+
	B52	1/3	45	-	+	+	-	+
	B54	3/3	45	-	+	+	-	+
	B57	3/3	45	+	-	-	-	+
	B65	3/3	28	+	+	+	+	+
	B66	1/3	45	NR	-	+	-	-
	B67	2/3	45	NR	-	+	-	+
	B68	2/3	45	NR	+	+	-	+
	B75	2/3	45	NR	-	+	-	+
	B86	1/3	45	NR	-	+	-	-
	Biguá (<i>Phalacrocorax brasilianus</i>)	B43	2/3	39	NR	+	+	-
B77		3/3	45	NR	+	+	-	-
Pinguim-de- magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	B14	1/3	45	NR	-	+	-	+
	B27	2/3	45	NR	-	+	-	+
	B28	3/3	45	NR	-	+	-	+
	B30	1/3	45	NR	-	+	-	+
	B31	3/3	45	NR	-	+	-	+
	B36	1/3	45	NR	-	+	-	+
	B56	1/3	45	+	-	+	-	+
	B60	1/3	45	-	+	-	-	+
	B63	3/3	45	-	-	+	-	-
	B71	1/3	45	-	-	+	-	-
	B72	1/3	45	-	+	-	-	-
	B73	1/3	45	-	+	+	-	-
	B88	2/3	45	-	+	-	-	-
B89	1/3	45	-	-	+	-	-	
B90	2/3	45	-	+	-	-	-	
Pardela-sombria (<i>Puffinus puffinus</i>)	B74	1/3	45	-	+	+	-	
Atobá-pardo (<i>Sula leucogaster</i>)	B45	1/3	45	-	-	+	-	+
Total de bioensaios	38	-	-	06	17	33	04	24

dpi: Dias pós-inoculação

NR: Não realizado

6.3 OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS EM AMOSTRAS DE EXSUDATO CÁRNEO (*MEAT JUICE*)

Das 372 aves marinhas analisadas no presente estudo, 125 (33.60%) apresentaram anticorpos contra *T. gondii* nas amostras de exsudato cárneo (Tabela 9). As espécies positivas foram *Spheniscus magellanicus* (63,20%; 79/125), *Larus dominicanus* (27,20%; 34/125), *Sula leucogaster* (4,00%; 5/125), *Phalacrocorax brasilianus* (1,60%; 2/125), *Sterna hirundinacea* (1,60%; 2/125), *Procellaria aequinoctialis* (1,60%; 2/125) e *Puffinus puffinus* (0,80%; 1/125). O título de anticorpos dentre as espécies positivas foi de 2 a 32 (Tabela 10).

A espécie *S. magellanicus* representou 63,20% do total de aves positivas, com 32,38% de positivos dentre o total analisado da espécie. Embora *L. dominicanus* tenha representado apenas 27,20% das aves positivas e, com mais da metade de amostras positivas (53,13%), foi a que apresentou maior ocorrência de anticorpos.

Tabela 9 - Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em amostras de exsudato cárneo de aves marinhas de vida livre no litoral Sul de Santa Catarina, Brasil

Espécie (Nome popular)	Nº amostras (%)	N de amostras % ¹	Nº positivos	Nº positivos % ²	(%) ³	Título
<i>Spheniscus magellanicus</i> (Pinguim-de-Magalhães)	244	65,59	79	32,38%	63,20%	2 a 32
<i>Larus dominicanus</i> (Gaivotão)	64	17,20	34	53,13%	27,20%	2 a 32
<i>Sula leucogaster</i> (Atobá-pardo)	15	4,03	5	33,33%	4,00%	2
<i>Phalacrocorax brasilianus</i> (Biguá)	17	4,57	2	11,76%	1,60%	2 a 16

<i>Sterna hirundinacea</i> (Trinta-réis-de-bico-vermelho)	5	1,34	2	40,00%	1,60%	2 a 8
<i>Procellaria aequinoctialis</i> (Pardela-preta)	7	1,88	2	28,57%	1,60%	4
<i>Puffinus puffinus</i> (Bobo-pequeno)	6	1,61	1	16,67%	0,80%	4
<i>Sterna hirundo</i> (Trinta-réis-boreal)	6	1,61	0	0,00%	0,00%	0
<i>Haematopus paliatus</i> (Piru-piru)	2	0,54	0	0,00%	0,00%	0
<i>Diomedea epomophora</i> (Albatroz-real)	1	0,27	0	0,00%	0,00%	0
<i>Fregata magnificens</i> (Fregata)	1	0,27	0	0,00%	0,00%	0
<i>Thalasseus acuflavidus</i> (Trinta-réis-de-bando)	1	0,27	0	0,00%	0,00%	0
<i>Thalasseus maximus</i> (Trinta-réis-real)	1	0,27	0	0,00%	0,00%	0
<i>Macronectes giganteus</i> (Petrel-gigante-do-Sul)	1	0,27	0	0,00%	0,00%	0
<i>Pachyptila vittata</i> (Faigão-de-bico-largo)	1	0,27	0	0,00%	0,00%	0
Total	372	100,00	125		100,00%	-

(%)1 Total de animais da espécie analisados em relação ao total de amostras analisadas.

(%)2 Positivos de cada espécie em relação ao total de amostras analisadas da espécie.

(%)3 Positivos de cada espécie em relação ao total de animais positivos.

Tabela 10 - Distribuição dos títulos analisados pela RIFI para anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em amostras de exsudato cárneo de aves marinhas do litoral Sul de SC, Brasil

Titulação	Nº de animais (%)
2	47 (37,60)
4	27 (21,60)
8	23 (18,40)
16	16 (12,80)
32	12 (9,60)
Total	125 (100)

6.4 ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Na n-PCR 18s, as amostras dos bioensaios 30, 67 (RIFI positivas) e 90 (cistos) apresentaram bandas de altura compatível com *Sarcocystis* spp.

Para a genotipagem, foram excluídas as amostras com resultado diferente de *T. gondii*, totalizando 27 amostras submetidas a esse teste. Oito amostras não apresentaram resultado para nenhum dos marcadores. Não foi possível definir os genótipos em 13 amostras dos bioensaios devido à ausência de resultados em alguns marcadores. A caracterização genotípica está descrita na Tabela 11.

Tabela 11 - Caracterização genotípica dos isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de animais marinhos no litoral Sul de Santa Catarina.

Isolado	Marcadores											Genótipo
	SAG1	5'+3' SAG 2	alt. SAG 2	SAG3	BTUB	GRA6	c22- 8	c29- 2	L358	PK1	Apico	
TgLdBr1 (B23) ¹	II ou III	I	I	III	I	III	u-1	I	I	u-1	I	-
TgLdBr2 (B44) ¹	u-1	I	II	III	nd	III	III	III	nd	III	III	-
TgLdBr3 (B48) ¹	I	I	II	III	I	III	I	I	I	III	I	-
TgLdBr4 (B54) ¹	II ou III	III	III	III	I	III	III	III	III	III	III	#170
TgPbBr1 (B55) ²	II ou III	III	III	III	I	III	III	III	III	III	III	#170
TgLdBr5 (B65) ¹	I	nd	I	III	I	III	II	I	nd	I	III	-

¹Gaiovtão (*Larus dominicanus*); ²Toninha (*Pontoporia blainvillei*). nd: não detectado

7 DISCUSSÃO

O presente estudo amplia o conhecimento acerca da ocorrência de *T. gondii* em animais marinhos no litoral Sul do Brasil. A detecção do parasito no ecossistema marinho evidencia a conexão entre os ambientes terrestre e aquático, o que sugere que a contaminação por escoamento de fezes de felídeos, hospedeiros definitivos, possa impactar a fauna marinha de forma significativa.

A detecção de *T. gondii* em 42,2% (38/90) das amostras avaliadas por meio do bioensaio em camundongos destaca a contaminação do ambiente marinho pelo parasito, resultando na infecção dos animais analisados.

Dentre os infectados, as aves foram a classe de maior ocorrência (35/90) no estudo, com predominância das espécies *Spheniscus magellanicus* (Pinguins-de-Magalhães) (15/90), *Larus dominicanus* (Gaivotões) (16/90) e *Phalacrocorax brasilianus* (Biguás) (2/90). O maior número de aves positivas pode estar relacionado a composição da amostra, formada principalmente por aves (76/90). Além disso, ao longo dos anos de 2021 a 2023, as aves marinhas representaram a maioria dos animais acompanhados pelo PMP-BS, principalmente por pinguins-de-Magalhães (*S. magellanicus*) (Comunica Bacia de Santos, 2021, 2022, 2023).

No Brasil, estima-se a presença de pelo menos 100 espécies de aves marinhas, dentre residentes ou migratórias, o que equivale a aproximadamente um quarto das espécies de aves marinhas conhecidas mundialmente (Nunes *et al.*, 2023).

O contato das aves marinhas com o parasito, determinado por meio de testes sorológicos, tem sido amplamente relatado. Em relação a sorologia do exsudato cárneo, foi possível detectar anticorpos contra *T. gondii* em 33,60% (125/372) das aves analisadas, com as espécies *S. magellanicus* e *L. dominicanus* concentrando o maior número de positivos.

Anticorpos contra *T. gondii* foram detectados em amostras de soro, pela técnica de RIFI, utilizando o anti-IgY de galinha assim como no presente estudo, em duas amostras de *S. magellanicus* e *L. dominicanus* (Sato, 2022). Além disso, outros estudos detectaram a presença de anticorpos em aves marinhas, utilizando a técnica de MAT, em 28% (28/100) e 12,4% (18/145) de (Pinguins-de-Magalhães) (ponto de corte de 1:20), e 47,4% *Sula leucogaster* (9/19) (Atobá pardo) (Gennari *et al.*, 2016a, 2016b; Acosta *et al.*, 2019). A ocorrência de anticorpos contra o parasito nessas espécies de aves

marinhas foi similar ao encontrado no presente estudo, 31,1% para *Spheniscus magellanicus* (Pinguim-de-Magalhães) e 38,5% para *Sula leucogaster* (Atobá-pardo).

A utilização do exsudato cárneo como matriz para a detecção de anticorpos tem sido bastante explorada pela facilidade de obtenção de amostras (carne para consumo e animais silvestres), especialmente das espécies em que não é possível a obtenção de soro sanguíneo (Bachand *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2019). Embora o MAT seja o mais amplamente utilizado para essa finalidade, já foi observado que o uso de ELISA ou RIFI em amostras de exsudato cárneo apresenta excelente concordância (Ranucci *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2019).

O ponto de corte utilizado no presente estudo, 1:2, menor que usualmente utilizado para pesquisa de anticorpos em outras matrizes, é necessário, visto que o soro sanguíneo tem uma maior concentração de anticorpos que o exsudato cárneo (Račka *et al.*, 2015; Wallander *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2019).

No Brasil, o DNA de *T. gondii* foi identificado em 23,8% (5/21) de *Larus dominicanus* (Gaivotão) e 25% (2/8) de *Puffinus puffinus* (Bobo-pequeno), a partir de amostras de tecido digeridas com pepsina, no qual a espécie *L. dominicanus* foi a mais afetada (Sato *et al.*, 2024). Na Itália, em aves do mesmo gênero (*Larus ribundus*), 22,2% (4/18) foram positivas para *T. gondii* na PCR (Nardoni *et al.*, 2019).

Esses achados corroboram com os obtidos no presente estudo, em que 61,5% (16/26) dos gaivotões foram positivos no bioensaio. Na região do mediterrâneo, em animais do mesmo gênero, dois isolados de *Larus michahellis* (Gaivota-de-patas-amaras) foram identificados por microssatélites e classificados em tipos II e III (Karakavuk *et al.*, 2018). Ainda no Mediterrâneo, um isolado proveniente de um indivíduo da mesma espécie foi classificado como tipo II (Gamble *et al.*, 2019).

Essas aves têm sido frequentemente utilizadas como bioindicadores da saúde do ecossistema marinho, e como dependem desse habitat para sua sobrevivência, sofrem efeitos diretos das alterações climáticas e poluição (Dias *et al.*, 2019; Martini; Mangini; Lange, 2022). As aves domésticas e selvagens também atuam como sentinelas da contaminação ambiental por *T. gondii*, desempenhando um importante papel na manutenção do ciclo como hospedeiros intermediários (Nardoni *et al.*, 2019; Dubey, J. P. *et al.*, 2020).

A dieta de *L. dominicanus* é generalista, composta por presas, dentre elas peixes e bivalves, assim como descarte de pescado e resíduos antropogênicos (Branco; Fracasso; Barbieri, 2009; Silva-Costa; Bugoni, 2013). *S. magellanicus* e *Puffinus puffinus* embora

sejam aves migratórias, têm dieta bastante semelhante à das gaivotas, contendo peixes, moluscos, cefalópodes e crustáceos (Baldassin *et al.*, 2010; Pinto; Siciliano; Di Benedetto, 2007; Petry *et al.*, 2008; Vanstreels *et al.*, 2020)

Ainda que os mamíferos correspondam a uma porção menor da amostra, em três dos 11 animais avaliados foi detectado *T. gondii*. Os positivos são da espécie *Pontoporia blainvillei* popularmente conhecidos como toninha. A detecção em mamíferos marinhos, embora em menor proporção, mesmo assim alta (27,3% - 3/11), destaca a capacidade do parasito em infectar as mais diversas espécies de hospedeiros

Até o momento, não há relatos da infecção por *T. gondii* em toninhas.

No entanto, já foi realizado o isolamento e detecção de anticorpos do parasito em amostras de Golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*), pertencentes à mesma ordem que a Toninha, e por meio da genotipagem, foi possível defini-las como genótipo tipo II e um *unique*. (Alvarado-Esquivel; Sánchez-Okrucky; Dubey, 2012; Bernal-Guadarrama *et al.*, 2014; Dubey *et al.*, 2008, 2009, 2009; Profeta *et al.*, 2015; Schaefer *et al.*, 2009; SHWAB *et al.*, 2014; Terracciano *et al.*, 2020; van de Velde *et al.*, 2016). A dieta de ambos é similar, composta por cefalópodes, peixes e crustáceos (Cremer; Pinheiro; Simões-Lopes, 2012; Milmann *et al.*, 2016; Neri *et al.*, 2022; Teixeira *et al.*, 2022; Wells *et al.*, 2022).

Como hospedeiros intermediários, as aves e mamíferos marinhos podem se infectar por meio da ingestão de oocistos esporulados presentes na água ou bioacumulados em peixes e bivalves filtradores, além de cistos teciduais em outros hospedeiros paratênicos.

O aumento da população humana e animal em áreas costeiras juntamente com a degradação de paisagens naturais para uso comercial, urbano e agrícola e tratamento ineficaz de efluentes favorecem o fluxo de patógenos e contaminantes, por meio do escoamento de águas superficiais, para o ambiente marinho (Shapiro *et al.*, 2010; VanWormer *et al.*, 2016; Cantrell *et al.*, 2020). Os oocistos de *T. gondii* tem a capacidade de se aderirem a debris, biofilme, planctons e microplásticos, favorecendo a sua dispersão em meio aquático (Shapiro *et al.*, 2012, 2014; Zhang *et al.*, 2022). Além disso, os oocistos têm grande resistência ambiental e conseguem manter sua viabilidade em água do mar por até 24 meses, possibilitando a bioacumulação por peixes, moluscos e crustáceos e, conseqüentemente, a infecção em animais marinhos (Lindsay *et al.*, 2003, 2004; Lindsay; Dubey, 2009; Esmerini; Gennari; Pena, 2010; Massie *et al.*, 2010; Cong *et al.*, 2021; Marangi *et al.*, 2022).

Na PCR 18S, três amostras foram identificadas como *Sarcocystis* spp.. Uma oriunda de *Larus dominicanus* (Gaivotão) e uma de *Spheniscus magellanicus* (Pinguim-de-Magalhães), cujos camundongos do bioensaio foram eutanasiados com 45 dpi, apresentaram titulação de anticorpos de 16 e foram positivos para o fragmento 529 pb de *T. gondii*. É possível que se trate de uma coinfeção entre *T. gondii* e *Sarcocystis* spp.

Assim como *T. gondii*, *Sarcocystis* spp. tem sido um achado frequente em animais marinhos, muitas vezes relatado na forma de coinfeção, especialmente em mamíferos (O'Byrne *et al.*, 2021). Já nas aves marinhas, a coinfeção ainda não foi relatada. Nos mamíferos, a associação entre esses protozoários tem sido frequentemente documentada. Em 62 (42,1%; 62/147) mamíferos marinhos encalhados foi identificada a coinfeção entre *T. gondii* e *Sarcocystis neurona*, relacionada a elevada mortalidade nos casos de encefalite (Gibson *et al.*, 2011). Ainda, em lontras nos EUA, já foi detectada a coinfeção e transmissão transplacentária de *T. gondii* e *S. neurona*, considerada uma das principais causas de morte nesses animais (Lindsay *et al.*, 2001; Conrad *et al.*, 2005; Shapiro *et al.*, 2016; Miller *et al.*, 2020).

A terceira amostra positiva, também oriunda de Pinguim-de-Magalhães (90), embora tenha apresentado cistos cerebrais nos camundongos do bioensaio, estes morfologicamente distintos do usualmente encontrado para *T. gondii*, foi positiva somente na PCR 18s, enquanto a sorologia e PCR 529 pb resultaram negativos. O gênero *Sarcocystis* forma cistos teciduais em seus hospedeiros intermediários, principalmente em músculo esquelético e sistema nervoso central (Dubey *et al.*, 2001). Em *Spheniscus magellanicus* (Pinguins-de-Magalhães) já foram detectados anticorpos contra *T. gondii*, no entanto o parasito não foi isolado por bioensaio, tampouco positivo para a PCR (Acosta *et al.*, 2018). No mesmo estudo, foi realizada a detecção molecular do gênero *Sarcocystis*, que apontou grande semelhança a *Sarcocystis falcatula* (Acosta *et al.*, 2018). Outras aves marinhas já foram analisadas para a pesquisa de *Sarcocystis*, apresentando diversas espécies. Em *Larus dominicanus* (Gaivotão) e *Phalacrocorax brasilianus* (Biguá) foram identificados *S. falcatula*, *S. halioti* e *Sarcocystis* sp., em *Puffinus puffinus* (Bobo-pequeno) *S. halioti*, e em *Sula leucogaster* (Atobá-pardo) *S. falcatula* (Sato *et al.*, 2022).

Com a dieta bastante generalista, as diferentes espécies de aves marinhas analisadas podem se infectar pela ingestão de cistos teciduais em animais infectados, ou oocistos presentes no meio aquático e/ou animais filtradores, visto que os oocistos se mantêm viáveis nesse ambiente (Lindsay *et al.*, 2004; Lindsay; Dubey, 2009; Massie *et al.*, 2010; Bigot-Clivot *et al.*, 2016). Os gaivotões, segunda espécie de maior ocorrência,

por ter uma vida longa podem atuar como sentinelas, indicando uma possível contaminação do ambiente marinho, assim como a manutenção do ciclo de *T. gondii* nesse meio (Miotto *et al.*, 2017; Moura *et al.*, 2018; Ebert; Branco; Barbieri, 2020).

No presente estudo, até o momento, foi possível caracterizar dois isolados a partir de amostras de Gaivotão (*L. dominicanus*) e Toninha (*Pontoporia blainvillei*). O genótipo encontrado em ambas as espécies corresponde ao #170 da plataforma ToxoDB (Tabela 13) e é considerado atípico, ou seja, difere da linhagem clonal.

O genótipo #170 foi isolado primeiramente em uma cabra nos EUA, e durante o bioensaio não mostrou ser virulenta aos camundongos (Dubey, J.P. *et al.*, 2011). O mesmo genótipo foi obtido em uma alpaca, também nos EUA, e não foi virulenta aos camundongos no bioensaio, visto que todos os inoculados permaneceram assintomáticos (Dubey *et al.*, 2014). Em fazendas localizadas em Maryland, EUA, três isolados de galinhas-caipiras foram caracterizados como #170 (Ying *et al.*, 2017).

O isolado de Gaivotão (TgLdBr4), no presente estudo, não apresentou virulência aos camundongos, visto que se mantiveram assintomáticos até o momento da eutanásia, assim como relatado em outros estudos que detectaram o mesmo genótipo (Dubey, J.P. *et al.*, 2011; Dubey *et al.*, 2014; Ying *et al.*, 2017). No entanto, a titulação de anticorpos variou entre 256 e 1024, o que sugere que a alta titulação pode não estar relacionada à manifestação de sinais clínicos. Embora seja o mesmo genótipo, o isolado de Toninha mostrou ser virulento aos camundongos, que foram a óbito em 21 dpi e apresentaram taquizoítos em lavado peritoneal e *imprint* de pulmão, além da titulação de anticorpos de 64 e 256.

A diferença de manifestação clínica entre os bioensaios pode estar relacionada à dose infectante de parasitos presente no inóculo, que não é uniforme, dado não ser viável quantificar o parasito nos tecidos utilizados para o bioensaio (Dubey, 2022).

Dos seis isolados obtidos no presente estudo, em quatro não foram encontrados genótipos correspondentes na plataforma ToxoDB, o que sugere que estes são genótipos ainda não descritos.

O isolado TgLdBr1, de Gaivotão, levou a óbito um camundongo aos 18 dpi, enquanto os restantes manifestaram sinais clínicos, como apatia, pelagem suja e eriçada com 29 dpi, e então eutanasiados. Na sorologia, a titulação foi de 256. Já o isolado TgLdBr2, também de Gaivotão, aparentemente não foi virulenta aos camundongos, visto que não apresentaram sinais clínicos. Já os camundongos do isolado TgLdBr3 apresentaram sinais clínicos, eutanasiados com 25 dpi, com a presença de taquizoítos.

Esses animais apresentaram a titulação de anticorpos de 256, enquanto o animal reinoculado veio a óbito com 13 dpi, com titulação de 64.

Os achados no presente trabalho confirmam a presença de *Toxoplasma gondii* no ambiente marinho do sul de Santa Catarina, e a sua grande diversidade genética na América do Sul, especialmente Brasil.

8 CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo evidenciam a ocorrência de *Toxoplasma gondii* em diferentes espécies de aves e mamíferos marinhos.

A infecção desses animais está relacionada a seus hábitos alimentares, que indica a contaminação do ambiente marinho e, possivelmente, a bioacumulação em animais filtradores que fazem parte da dieta.

Os resultados contribuem para o estudo da epidemiologia e da diversidade genética de *T. gondii*.

Novos estudos são necessários para avaliar o impacto da infecção pelo parasito nessa população animal, assim como o papel das espécies migratórias na sua dispersão.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, I. C. L., SOUZA-FILHO, A. F., MUÑOZ-LEAL, S. *et al.* Evaluation of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Leptospira spp.* in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) on Magdalena Island, Chile. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, [s. l.], v. 16, n. March, p. 14–17, 2019.
- ACOSTA, I. C. L., SOARES, R. M., MAYORGA, L. F. S. P. *et al.* Occurrence of tissue cyst forming coccidia in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) rescued on the coast of Brazil. **PLoS ONE**, [s. l.], 2018.
- ACOSTA, I. da C. L. Pesquisa de coccídios da família Sarcocystidae em pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encalhados na costa brasileira. 2018. - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-06022018-145818/>.
- AGUIRRE, A. A., LONGCORE, T., BARBIERI, M. *et al.* The One Health approach to toxoplasmosis: Epidemiology, control, and prevention strategies. **EcoHealth**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 378–390, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01405-7>.
- AJZENBERG, D., COGNÉ, N., PARIS, L. *et al.* Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 186, n. 5, p. 684–689, 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/342663>.
- AL-AREDHI, H. S.; AL-MAYALI, H. M. Molecular diagnosis of zoonosis parasites between human and aquatic birds in AL-Delmaj Marsh, Iraq. **Biochem. Cell. Arch.**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1673–1677, 2020.
- ALMERIA, S.; DUBEY, J. P. Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 135, p. 371–385, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528820310572>.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; SÁNCHEZ-OKRUCKY, R.; DUBEY, J. P. Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in captive marine mammals in Mexico. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 184, n. 2–4, p. 321–324, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401711006005>.
- BACHAND, N., RAVEL, A., LEIGHTON, P. *et al.* Serological and molecular detection of *Toxoplasma gondii* in terrestrial and marine wildlife harvested for food in Nunavik, Canada. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3408-9>.
- BALDASSIN, P., SANTOS, R. A., DA CUNHA, J. M. *et al.* Cephalopods in the diet of Magellanic penguins *Spheniscus magellanicus* found on the coast of Brazil. [s. l.], v. 38, p. 55–57, 2010.
- BÁRTOVÁ, E., LUKÁŠOVÁ, R., VODIČKA, R. *et al.* Epizootological study on *Toxoplasma gondii* in zoo animals in the Czech Republic. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 187, n. November 2017, p. 222–228, 2018.

BERNAL-GUADARRAMA, M. J., SALICHS, J., ALMUNIA, J. *et al.* Development of an indirect immunofluorescence technique for the diagnosis of toxoplasmosis in bottlenose dolphins. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 113, n. 2, p. 451–455, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-013-3674-y>.

BIGAL, E., MORICK, D., SCHEININ, A. P. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in three common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*); A first description from the Eastern Mediterranean Sea. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 258, p. 74–78, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401718302279>.

BIGOT-CLIVOT, A., LADEIRO, M. P., LEPOUTRE, A. *et al.* Bioaccumulation of *Toxoplasma* and *Cryptosporidium* by the freshwater crustacean *Gammarus fossarum*: Involvement in biomonitoring surveys and trophic transfer. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 133, p. 188–194, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651316302597>.

BOWMAN, D. **Georgis' Parasitology for Veterinarians**. [S. l.]: Elsevier, 2020.

BRANCO, J. O.; FRACASSO, H. A. A.; BARBIERI, E. Breeding biology of the Kelp Gull (*Larus dominicanus*) at Santa Catarina Coast, Brazil. **Ornitologia Neotropical**, [s. l.], v. 20, p. 409–419, 2009.

CABEZÓN, O., CERDÀ-CUÉLLAR, M., GARCÍA-BOCANEGRA, I. *et al.* *Toxoplasma gondii* Infection in seagull chicks is related to the consumption of freshwater food resources. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. e0150249, 2016. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0150249>.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 6, p. 117–118, 1964.

CANTRELL, D. L., GRONER, M. L., BEN-HORIN, T. *et al.* Modeling pathogen dispersal in marine fish and shellfish. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 239–249, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.013>.

CARLSON-BREMER, D., COLEGROVE, K. M., GULLAND, F. M. D. *et al.* Epidemiology and pathology of *Toxoplasma gondii* in free-ranging California sea lions (*Zalophus californianus*). **Journal of Wildlife Diseases**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 362–373, 2015.

CARME, B., DEMAR, M., AJZENBERG, D. *et al.* Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 656–658, 2009. Disponível em: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/4/08-1306_article.htm.

COMUNICA BACIA DE SANTOS. **Na área da Baía de Santos, Projeto de Monitoramento de Praias registrou mais de 19 mil animais em 2023**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://comunicabaciadesantos.petrobras.com.br/w/na-area-da-bacia-de-santos-projeto-de-monitoramento-de-praias-registrou-mais-de-19-mil-animais-em-2023>. Acesso em: 24 jun. 2024.

COMUNICA BACIA DE SANTOS. **PMP-BS EM 2021: MAIS DE 15 MIL ANIMAIS REGISTRADOS.** [S. l.], 2021. Disponível em: <https://comunicabaciadesantos.petrobras.com.br/w/pmp-bs-em-2021-mais-de-15-mil-animais-registrados>. Acesso em: 24 jun. 2024.

COMUNICA BACIA DE SANTOS. **Projeto de monitoramento de praias encontra mais de 30 mil animais machucados no litoral brasileiro em 2022.** [S. l.], 2022. Disponível em: <https://comunicabaciadesantos.petrobras.com.br/w/projeto-de-monitoramento-de-praias-encontra-mais-de-30-mil-animais-machucados-no-litoral-brasileiro-em-2022>. Acesso em: 24 jun. 2024.

CONG, W., LI, M. Y., ZOU, Y. *et al.* Prevalence, genotypes and risk factors for *Toxoplasma gondii* contamination in marine bivalve shellfish in offshore waters in eastern China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 213, p. 112048, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651321001597>. Acesso em: 16 jan. 2024.

CONRAD, P. A., MILLER, M. A., KREUDER, C. *et al.* Transmission of *Toxoplasma*: Clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 35, n. 11–12, p. 1155–1168, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751905002444>.

COSTA-SILVA, S., SACRISTÁN, C., GONZALES-VIERA, O. *et al.* *Toxoplasma gondii* in cetaceans of Brazil: a histopathological and immunohistochemical survey. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 395–402, 2019. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612019000300395&tlng=en.

CREMER, M. J.; PINHEIRO, P. C.; SIMÕES-LOPES, P. C. Prey consumed by Guiana dolphin *Sotalia guianensis* (Cetacea, Delphinidae) and franciscana dolphin *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) in an estuarine environment in southern Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 131–137, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-47212012000200003&lng=en&tlng=en. Acesso em: 8 jul. 2024.

CUNHA, M. M., CARNEIRO, A. C. A. V., COSTA, J. G. L. *et al.* Genotyping of *Toxoplasma gondii* directly from human and animal biological samples: from partial genotypes to a new genotype. **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 157–160, 2016. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/10.1645/15-813>.

DEEM, S. L., MERKEL, J., BALLWEBER, L. *et al.* Exposure to *Toxoplasma gondii* in Galapagos Penguins (*Spheniscus mendiculus*) and Flightless Cormorants (*Phalacrocorax harrisi*) in the Galapagos Islands, Ecuador. **Journal of Wildlife Diseases**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 1005–1011, 2010.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, [s. l.], v. 208, n. 3–4, p. 191–364, 2002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848602000571>. Acesso em: 12 jul. 2024.

DI GUARDO, G., PROIETTO, U., DI FRANCESCO, C. E. *et al.* Cerebral toxoplasmosis in Striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded along the ligurian sea coast of Italy. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 245–253, 2010. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985809358036>.

DI GUARDO, G. *et al.* Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates in meningoencephalitis affected striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Italy. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 183, n. 1–2, p. 31–36, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.004>.

DIAS, M. P., DI CESARE, A., OTRANTO, D. *et al.* Threats to seabirds: A global assessment. **Biological Conservation**, [s. l.], v. 237, p. 525–537, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006320719307499>. Acesso em: 25 jun. 2024.

DUBEY, J. P., MURATA, F. H. A., CERQUEIRA-CÉZAR, C. K. *et al.* Epidemiologic significance of *Toxoplasma gondii* infections in turkeys, ducks, ratites and other wild birds: 2009–2020. **Parasitology**, [s. l.], v. 148, n. 1, p. 1–30, 2020. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182020001961/type/journal_article. Acesso em: 26 jun. 2024.

DUBEY, J. P., VELMURUGAN, G. V., RAJENDRAN, C. *et al.* Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 41, n. 11, p. 1139–1147, 2011.

DUBEY, J.P., RAJENDRAN, C., FERREIRA, L. R. *et al.* High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 827–833, 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751911000981>. Acesso em: 8 jul. 2024.

DUBEY, J. P., CASEY, S. J., ZAJAC, A. M. *et al.* Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from alpaca (*Vicugna pacos*) and sheep (*Ovis aries*). **Tropical Animal Health and Production**, [s. l.], v. 46, n. 8, p. 1503–1507, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11250-014-0652-z>. Acesso em: 8 jul. 2024.

DUBEY, J. P., FAIR, P. A., SUNDAR, N. *et al.* Isolation of *Toxoplasma gondii* from Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 94, n. 4, p. 821–823, 2008. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-1444.1>. Acesso em: 5 jul. 2024.

DUBEY, J. P., FERREIRA, L. R., MARTINS, J. *et al.* Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. **Parasitology**, [s. l.], v. 139, n. 1, p. 1–13, 2012. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182011001673/type/journal_article.

DUBEY, J. P., MURATA, F. H. A., CERQUEIRA-CEZAR, C. K. *et al.* Recent epidemiologic and clinical importance of *Toxoplasma gondii* infections in marine mammals: 2009-2020. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], p. 109296, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401720302764>.

DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 75–77, 1998. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401797001350>.

DUBEY, J. P., SAVILLE, W. J., STANEK, J. F. *et al.* *Sarcocystis neurona* infections in raccoons (*Procyon lotor*): evidence for natural infection with *Sarcocysts*, transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*), and experimental induction of neurologic disease in raccoons. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 100, n. 3–4, p. 117–129, 2001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401701005003>. Acesso em: 16 jul. 2024.

DUBEY, J. P. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In: WEISS, L. M.; KIM, K. (org.). ***Toxoplasma gondii***. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 1–19. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128150412000013>.

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 467–475, 2008.

DUBEY, J. P., ZARNKE, R., THOMAS, N. J. *et al.* *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 116, n. 4, p. 275–296, 2003.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - A waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 126, n. 1-2 SPEC.ISS., p. 57–72, 2004.

DUBEY, J. P., MERGL, J., SUNDAR, N. *et al.* Toxoplasmosis in captive dolphins (*Tursiops truncatus*) and walrus (*Odobenus rosmarus*). **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 82–85, 2009. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-1764.1>.

DUBEY, J. P., LAGO, E. G., GENNARI, S. M. *et al.* **Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology**. [S. l.: s. n.], 2012-. ISSN 00311820.v. 139

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. [S. l.]: CRC Press, 2022.

DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 337–339, 1987.

EBERT, L. A.; BRANCO, J. O.; BARBIERI, E. Evaluation of trace elements in feathers of young kelp gull *Larus dominicanus* along the coast of Santa Catarina, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 160, p. 111676, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X20307943>. Acesso em: 16 jul. 2024.

ESMERINI, P. de O. **Isolamento e detecção molecular do *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) de moluscos bivalves marinhos comercializados no mercado de**

peixes do Município de Santos no Estado de São Paulo. 2009. - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-23042009-145558/>.

ESMERINI, P. O.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 170, n. 1–2, p. 8–13, 2010.

FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: From land to sea. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 531–536, 2004.

FEKKAR, A., AJZENBERG, D., BODAGHI, B. *et al.* Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* in ocular fluid samples from 20 patients with ocular toxoplasmosis: predominance of type II in France. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 1513–1517, 2011. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/49/4/1513>.

FOURNIER, G. F. da S. R. **Estudo epidemiológico de *Toxoplasma gondii* em animais silvestres e gatos domésticos de duas unidades de conservação na cidade de Natal, RN.** 2013. - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-03062014-101711/>.

GAMBLE, A., RAMOS, R., PARRA-TORRES, Y. *et al.* Exposure of yellow-legged gulls to *Toxoplasma gondii* along the Western Mediterranean coasts: Tales from a sentinel. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, [s. l.], v. 8, p. 221–228, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213224418301342>. Acesso em: 8 jul. 2024.

GAZZONIS, A. L., ZANZANI, S. A., VILLA, L. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection in meat-producing small ruminants: Meat juice serology and genotyping. **Parasitology International**, [s. l.], v. 76, p. 102060, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383576920300106>.

GENNARI, S. M., NIEMEYER, C., SOARES, H. S. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in seabirds from Abrolhos Archipelago, Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 226, n. 8819081014, p. 50–52, 2016a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.016>.

GENNARI, S. M., NIEMEYER, C., CATÃO-DIAS, J. *et al.* Survey of *Toxoplasma gondii* antibodies in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus* forster, 1781). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 364–366, 2016b. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/10.1638/2015-0103.1>.

GERACI, J. R.; LOUNSBURY, V. J. **Marine mammals ashore: a field guide for strandings.** Baltimore: National Aquarium in Baltimore, 2005.

GERHOLD, R. W., SARAF, P., CHAPMAN, A. *et al.* *Toxoplasma gondii* seroprevalence and genotype diversity in select wildlife species from the southeastern United States. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 508, 2017. Disponível em: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2456-2>.

GIBSON, A. K., RAVERTY, S., LAMBOURN, D. M. *et al.* Polyparasitism is associated with increased disease severity in *Toxoplasma gondii*-infected marine sentinel species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 14–16, 2011.

GONZALES-VIERA, O., MARIGO, J., RUOPPOLO, V. *et al.* Toxoplasmosis in a Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*) from Paraná, Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 191, n. 3–4, p. 358–362, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.012>.

GRATTAROLA, C., GIORDA, F., IULINI, B. *et al.* Meningoencephalitis and *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella* spp. coinfection in a dolphin in Italy. **Diseases of Aquatic Organisms**, [s. l.], v. 118, n. 2, p. 169–174, 2016. Disponível em: <http://www.int-res.com/abstracts/dao/v118/n2/p169-174/>.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 634–640, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>.

HOMAN, W. L., VERCAMMEN, M., DE BRAEKELEER, J. *et al.* Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Note: Nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to GenBank™ database with the accession nu. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 69–75, 2000. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751999001708>.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 172, n. 6, p. 1561–1566, 1995. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/172.6.1561>.

JENSEN, S.-K., NYMO, I. H., FORCADA, J. *et al.* Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pinnipeds from Antarctica: TABLE 1:. **Veterinary Record**, [s. l.], v. 171, n. 10, p. 249.2-249, 2012. Disponível em: <https://veterinaryrecord.bmj.com/lookup/doi/10.1136/vr.100848>.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 124, n. 1, p. 10–25, 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489409000745>.

KARAKAVUK, M., ALDEMIR, D., MERCIER, A. *et al.* Prevalence of toxoplasmosis and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains isolated in wild birds of prey and their relation with previously isolated strains from Turkey. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. e0196159, 2018. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0196159>.

KHAN, A., DUBEY, J. P., SU, C. *et al.* Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 645–655, 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751911000464>.

LINDSAY, D. S., THOMAS, N. J., ROSYPAL, A. C. *et al.* Dual *Sarcocystis neurona* and *Toxoplasma gondii* infection in a Northern sea otter from Washington state, USA.

Veterinary Parasitology, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 319–327, 2001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401701004113>. Acesso em: 16 jul. 2024.

LINDSAY, D. S., DUBEY, J. P., BUTLER, J. M. *et al.* Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 73, n. 1–2, p. 27–33, 1997. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401797000484>.

LINDSAY, D. S., COLLINS, M. V., MITCHELL, S. M. *et al.* Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. s1, p. 687–688, 2003. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00688.x>.

LINDSAY, D. S., COLLINS, M.V, MITCHELL, S. M. *et al.* Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 90, n. 5, p. 1054–1057, 2004. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-296R>.

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

MARANGI, M., LAGO, N., MANCINELLI, G. *et al.* Occurrence of the protozoan parasites *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* in the invasive Atlantic blue crab *Callinectes sapidus* from the Lesina Lagoon (SE Italy). **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 176, p. 113428, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X22001102>. Acesso em: 8 jul. 2024.

MARINO, A. M. F., GIUNTA, R. P., SALVAGGIO, A. *et al.* *Toxoplasma gondii* in edible fishes captured in the Mediterranean basin. **Zoonoses and Public Health**, [s. l.], v. 66, n. 7, p. 826–834, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/zph.12630>.

MARTINI, R.; MANGINI, P. R.; LANGE, R. R. Seabirds health and conservation medicine in Brazil. **Journal for Nature Conservation**, [s. l.], v. 69, p. 126238, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S161713812200111X>. Acesso em: 25 jun. 2024.

MASSIE, G. N., WARE, M. W., VILLEGAS, E. N. *et al.* Uptake and transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by migratory, filter-feeding fish. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 169, n. 3–4, p. 296–303, 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401710000063>.

M.B.L.C PINTO; S. SICILIANO; A. P. M. DI BENEDITTO. **Stomach contents of the Magellanic Penguin *Spheniscus magellanicus* from the northern distribution limit on the Atlantic coast of Brazil**, [s. l.], v. 35, p. 77–78, 2007.

MILLER, M. A., MORIARTY, M. E., HENKEL, L. *et al.* Predators, disease, and environmental change in the nearshore ecosystem: mortality in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) From 1998–2012. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 7, p. 582, 2020. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2020.00582/full>. Acesso em: 16 jul. 2024.

MILMANN, L., DANILEWICZ, D., MACHADO, R. *et al.* Feeding ecology of the common bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, in southern Brazil: analyzing its prey and the potential overlap with fisheries. **Brazilian Journal of Oceanography**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 415–422, 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-87592016000400415&lng=en&tlng=en. Acesso em: 8 jul. 2024.

MIOTTO, M. L., CARVALHO, B. M., SPACH, H. L. *et al.* Ictiofauna demersal na alimentação do gaivotão (*Larus dominicanus*) em um ambiente subtropical. **Ornitologia Neotropical**, [s. l.], v. 28, p. 27–36, 2017. Disponível em: <https://journals.sfu.ca/ornneo/index.php/ornneo/article/view/108>. Acesso em: 16 jul. 2024.

MOURA, J. F., TAVARES, D. C., LEMOS, L. S. *et al.* Interspecific variation of essential and non-essential trace elements in sympatric seabirds. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 242, p. 470–479, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749117338812>. Acesso em: 16 jul. 2024.

NARDONI, S., ROCCHIGIANI, G., VARVARO, I. *et al.* Serological and Molecular Investigation on *Toxoplasma gondii* Infection in Wild Birds. **Pathogens**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 58, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/8/2/58>.

NERI, A., SARTOR, P., VOLIANI, A. *et al.* Diet of Bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821), in the Northwestern Mediterranean sea. **Diversity**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 21, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-2818/15/1/21>. Acesso em: 8 jul. 2024.

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**, [s. l.], v. 147, p. 763–766, 1908.

NUNES, G. T., EFE, M. A., SERAFINI, P. P. *et al.* Aves marinhas no Brasil: Desafios para a conservação. **Oecologia Australis**, [s. l.], v. 27, n. 03, 2023. Disponível em: <https://revistas.ufrj.br/index.php/oa/article/view/52200>. Acesso em: 25 jun. 2024.

OBUSAN, M. C. M., VILLANUEVA, R. M. D., SIRINGAN, M. A. T. *et al.* *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* in stranded representatives of wild cetaceans in the Philippines. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 372, 2019. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-019-2112-5>.

O'BYRNE, A. M., LAMBOURN, D. M., REJMANEK, D. *et al.* *Sarcocystis neurona* Transmission from Opossums to Marine Mammals in the Pacific Northwest. **EcoHealth**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 84–94, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10393-021-01536-w>. Acesso em: 16 jul. 2024.

PENA, H. F. J., GENNARI, S. M., DUBEY, J. P. *et al.* Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, [s.

l.], v. 38, n. 5, p. 561–569, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751907003359>.

PETROBRAS. **Projeto executivo integrado do PMP-BS**. [S. l.: s. n.], 2019.

PETRY, M. V., FONSECA, V. S. D. S., KRÜGER-GARCIA, L. *et al.* Shearwater diet during migration along the coast of Rio Grande do Sul, Brazil. **Marine Biology**, [s. l.], v. 154, n. 4, p. 613–621, 2008. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00227-008-0954-7>. Acesso em: 8 jul. 2024.

PLOEG, M.; ULTEE, T.; KIK, M. Disseminated Toxoplasmosis in Black-Footed Penguins (*Spheniscus demersus*). **Avian Diseases**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 701–703, 2011. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1637/9700-030411-Case.1>.

PRESTRUD, K. W., ÅSBAKK, K., FUGLEI, E. *et al.* Serosurvey for *Toxoplasma gondii* in arctic foxes and possible sources of infection in the high Arctic of Svalbard. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 150, n. 1–2, p. 6–12, 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401707004888>.

PRETTI, C., MANCIANTI, F., NARDONI, S. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* infection in dolphins stranded along the Tuscan coast, Italy. **Revue Méd. Vét.**, [s. l.], v. 10, p. 428–431, 2010.

PROFETA, F., DI FRANCESCO, C. E., MARSILIO, F. *et al.* Retrospective seroepidemiological investigations against Morbillivirus, *Toxoplasma gondii* and *Brucella* spp. in cetaceans stranded along the Italian coastline (1998-2014). **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 101, p. 89–92, 2015.

RAČKA, K., BARTOVÁ, E., BUDÍKOVÁ, M. *et al.* Survey of *Toxoplasma gondii* antibodies in meat juice of wild boar (*Sus scrofa*) in several districts of the Czech Republic. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 231–235, 2015. Disponível em: <http://www.journalssystem.com/aaem/Survey-of-i-Toxoplasma-gondii-i-antibodies-in-meat-juice-of-wild-boar-i-Sus-scrofa-i-in-several-districts-of-the-Czech-Republic,72265,0,2.html>. Acesso em: 16 jul. 2024.

RANUCCI, D., VERONESI, F., BRANCIARI, R. *et al.* Evaluation of an Immunofluorescence Antibody Assay for the Detection of Antibodies Against *Toxoplasma gondii* in Meat Juice Samples from Finishing Pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 75–78, 2012. Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2011.0930>. Acesso em: 13 jul. 2024.

RATCLIFFE, H. L.; WORTH, C. B. Toxoplasmosis of captive wild birds and mammals. **The American journal of pathology**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 655–667, 1950. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14846916>.

REISFELD, L., SACRISTÁN, C., MACHADO, E. F. *et al.* Toxoplasmosis and *Sarcocystis* spp. infection in wild pinnipeds of the Brazilian coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, [s. l.], v. 136, n. 3, p. 235–241, 2019.

RENGIFO-HERRERA, C., ORTEGA-MORA, L. M., ALVAREZ-GARCÍA, G. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in Antarctic pinnipeds. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 190, n. 1–2, p. 259–262, 2012.

ROSTAMI, A., RIAHI, S. M., GAMBLE, H. R. *et al.* Global prevalence of latent toxoplasmosis in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 673–683, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X20300331>.

RYSER-DEGIORGIS, M.-P. Wildlife health investigations: needs, challenges and recommendations. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 9, p. 1–17, 2013.

SATO, A. P. **Diagnóstico sorológico, histopatológico e molecular de *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. em aves silvestres**. 2022. 130 f. - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2022. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1884/81141>.

SATO, A. P., DA SILVA, T. C. E., DE PONTES, T. P. *et al.* Molecular characterization of *Sarcocystis* spp. in seabirds from southern Brazil. **Parasitology International**, [s. l.], v. 90, p. 102595, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383576922000599>. Acesso em: 16 jul. 2024.

SATO, A. P., DA SILVA, T. C. E., DE PONTES, T. P. *et al.* Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in seabirds collected along the coast of Santa Catarina, Brazil. [s. l.], v. 33, n. 2, 2024.

SCHAEFER, A. M., REIF, J. S., GOLDSTEIN, J. D. *et al.* Serological evidence of exposure to selected viral, bacterial, and protozoal pathogens in free-ranging atlantic Bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Indian River Lagoon, Florida, and Charleston, South Carolina. **Aquatic Mammals**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 163–170, 2009. Disponível em: http://www.aquaticmammalsjournal.org/index.php?option=com_content&view=article&id=126:serological-evidence-of-exposure-to-selected-viral-bacterial-and-protozoal-pathogens-in-free-ranging-atlantic-bottlenose-dolphins-tursiops-truncatus-from-the-indian-rive.

SHAPIRO, K., KRUSOR, C., MAZZILLO, F. F. M. *et al.* Aquatic polymers can drive pathogen transmission in coastal ecosystems. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 281, n. 1795, p. 20141287, 2014. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2014.1287>. Acesso em: 8 jul. 2024.

SHAPIRO, K., SILVER, M. W., LARGIER, J. L. *et al.* Association of *Toxoplasma gondii* oocysts with fresh, estuarine, and marine macroaggregates. **Limnology and Oceanography**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 449–456, 2012. Disponível em: <https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.4319/lo.2012.57.2.0449>. Acesso em: 8 jul. 2024.

SHAPIRO, K., MILLER, M. A., PACKHAM, A. E. *et al.* Dual congenital transmission of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* in a late-term aborted pup from a chronically infected southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). **Parasitology**, [s. l.], v. 143, n. 3, p. 276–288, 2016. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182015001377/type/journal_article. Acesso em: 16 jul. 2024.

SHAPIRO, K., CONRAD, P. A., MAZET, J. A. K. *et al.* Effect of Estuarine Wetland Degradation on Transport of *Toxoplasma gondii* Surrogates from Land to Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 76, n. 20, p. 6821–6828, 2010. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01435-10>. Acesso em: 8 jul. 2024.

SHAPIRO, K., BAHIA-OLIVEIRA, L., DIXON, B. *et al.* Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. **Food and Waterborne Parasitology**, [s. l.], v. 15, 2019.

SHARMA, R., PARKER, S., AL-ADHAMI, B. *et al.* Comparison of tissues (heart vs. brain) and serological tests (MAT, ELISA and IFAT) for detection of *Toxoplasma gondii* in naturally infected wolverines (*Gulo gulo*) from the Yukon, Canada. **Food and Waterborne Parasitology**, [s. l.], v. 15, p. e00046, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00046>.

SHWAB, E. K., ZHU, X-Q., MAJUMDAR, D. *et al.* Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, [s. l.], v. 141, n. 4, p. 453–461, 2014. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182013001844/type/journal_article.

SHWAB, E. K., SARAF, P., ZHU, X-Q. *et al.* Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 115, n. 29, p. E6956–E6963, 2018. Disponível em: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1722202115>.

SILVA, C. M. *et al.* First report of detection of *Toxoplasma gondii* DNA in oysters (*Crassostrea* sp.) in the state of Maranhão. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 29, n. 3, 2020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612020000300402&tlng=en.

SILVA, M. A. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* de aves e mamíferos silvestres de Pernambuco, Brasil**. 2016. - Universidade Federal Rural de Pernambuco, [s. l.], 2016. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/7155>.

SILVA, M. A., SILVA, A. L. P. *et al.* Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from free-ranging and captive birds and mammals in Pernambuco state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 481–487, 2018.

SILVA, L. A., ANDRADE, R. O., CARNEIRO, A. C. A. V. *et al.* Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. e90237, 2014. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0090237>.

SILVA-COSTA, A.; BUGONI, L. Feeding ecology of Kelp Gulls (*Larus dominicanus*) in marine and limnetic environments. **Aquatic Ecology**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 211–224, 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10452-013-9436-1>. Acesso em: 8 jul. 2024.

SOGORB, F. S. *et al.* Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 314–320, 1972.

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

SU, C., SHWAB, K., ZHOU, P. *et al.* Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, [s. l.], v. 137, n. 1, p. 1–11, 2010. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182009991065/type/journal_article.

SU, C.; DUBEY, J. P. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* strains. In: TONKIN, C. J. (org.). **Toxoplasma gondii: methods and protocols**. [S. l.]: Springer Nature, 2020. p. 49–80. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9857-9_3.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 841–848, 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751906001056>.

TEIXEIRA, P. H. O., MONTANINI, G., FARRO, A. P. C. *et al.* Trophic ecology and small-scale differentiation of ecological groups of franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*, in southeastern Brazil, revealed by carbon and nitrogen stable isotopes. **Marine Mammal Science**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. e13128, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mms.13128>. Acesso em: 8 jul. 2024.

TERRACCIANO, G., FICHI, G., COMMENTALE, A. *et al.* Dolphins Stranded along the Tuscan Coastline (Central Italy) of the “Pelagos Sanctuary”: A Parasitological Investigation. **Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 612, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/9/8/612>.

TRAVERSA, D., DI CESARE, A., CASALONE, C. *et al.* Molecular evidence for *Toxoplasma gondii* in the brain of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded along the Ligurian Sea coast of Italy. **Nature Precedings**, [s. l.], 2010. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/npre.2010.4930.1>.

VAN BRESSEM, M. F., RAGA, J. A., DI GUARDO, G. *et al.* Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. **Diseases of Aquatic Organisms**, [s. l.], v. 86, p. 143–157, 2009.

VAN DE VELDE, N., DEVLEESSCHAUWER, B., LEOPOLD, M. *et al.* *Toxoplasma gondii* in stranded marine mammals from the North Sea and Eastern Atlantic Ocean: Findings and diagnostic difficulties. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 230, p. 25–32, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.021>.

VANSTREELS, R. E. T., DUTRA, D. D. A., SANTOS, A. P. *et al.* First report of avian malaria in a Manx shearwater (*Puffinus puffinus*). **Parasitology International**, [s. l.], v. 78, p. 102148, 2020. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383576920300982>. Acesso em: 8 jul. 2024.

VANWORMER, E., CARPENTER, T. E., SINGH, P. *et al.* Coastal development and precipitation drive pathogen flow from land to sea: Evidence from a *Toxoplasma gondii* and felid host system. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. June, p. 1–9, 2016.

VELMURUGAN, G. V.; SU, C.; DUBEY, J. P. Isolate designation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in the United States. **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 95–99, 2009. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-1746.1>.

VERMA, S. K., AJZENBERG, A., RIVERA-SANCHEZ, A. *et al.* Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from Portugal, Austria and Israel reveals higher genetic variability within the type II lineage. **Parasitology**, [s. l.], v. 142, n. 7, p. 948–957, 2015. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182015000050/type/journal_article.

VILARES, A., GARGATÉ, M. J., FERREIRA, I. *et al.* Molecular and virulence characterization of *Toxoplasma gondii* strains isolated from humans in Portugal. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 116, n. 3, p. 979–985, 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-017-5374-5>.

VILLENA, I., DURAND, B., AUBERT, D. *et al.* New strategy for the survey of *Toxoplasma gondii* in meat for human consumption. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 183, n. 3–4, p. 203–208, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401711005346>.

VITALIANO, S. N., SOARES, H. S., MINERVINO, A. H. H. *et al.* Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 276–283, 2014.

WALLANDER, C., FRÖSSLING, J., VÅGSHOLM, I. *et al.* “Meat Juice” is not a homogeneous serological matrix. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 280–288, 2015. Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2014.1863>.

WELLS, R. S., CREMER, M. J., BERNINSONE, L. G. *et al.* Tagging, ranging patterns, and behavior of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) off Argentina and Brazil: Considerations for conservation. **Marine Mammal Science**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 571–605, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mms.12879>. Acesso em: 8 jul. 2024.

WENDTE, J. M.; GIBSON, A. K.; GRIGG, M. E. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: New perspectives from parasite genotypes in wildlife. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 182, n. 1, p. 96–111, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.018>.

WITTER, R., PENA, H. F. J., MAIA, M. O. *et al.* Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* in the Midwestern Brazil revealed high genetic diversity and new

genotypes. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 212, p. 105681, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X20305076>.

YANG, Y., YU, S-M., CHEN, K. *et al.* Temperature is a key factor influencing the invasion and proliferation of *Toxoplasma gondii* in fish cells. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 217, p. 107966, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489420302034>.

YBAÑEZ, R. H. D.; YBAÑEZ, A. P.; NISHIKAWA, Y. Review on the current trends of toxoplasmosis serodiagnosis in humans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.00204/full>.

YING, Y., VERMA, S. K., KWOK, O. C. H. *et al.* Prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens from grocery stores and farms in Maryland, Ohio and Massachusetts, USA. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 116, n. 5, p. 1591–1595, 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-017-5420-3>. Acesso em: 8 jul. 2024.

ZHANG, E., KIM, M., RUEDA, L. *et al.* Association of zoonotic protozoan parasites with microplastics in seawater and implications for human and wildlife health. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 6532, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-10485-5>. Acesso em: 8 jul. 2024.

ZHANG, M., YANG, Z., WANG, S. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in shellfish and fish in parts of China. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 200, n. 1–2, p. 85–89, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.022>.

APÊNDICE A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA-UDESC



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Soroprevalência, isolamento e caracterização molecular de *Toxoplasma gondii* em mamíferos e aves marinhas de vida livre no litoral Sul de Santa Catarina, Brasil.", protocolada sob o CEUA nº 9958171021 (ID 001444), sob a responsabilidade de **Anderson Barbosa de Moura** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 22/10/2021.

We certify that the proposal "Seroprevalence, isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in free-living mammals and seabirds in the southern coast of Santa Catarina, Brazil.", utilizing 150 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 9958171021 (ID 001444), under the responsibility of **Anderson Barbosa de Moura** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 10/22/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **01/2022** a **12/2025**

Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 12 meses**

N: **150**

Linhagem: **albinos swiss**

Peso: **50 a 150 g**

Local do experimento: **Biotério do CAV/UDESC**

Lages, 22 de outubro de 2021

José Cristani
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

APÊNDICE B – AUTORIZAÇÃO ABIO (IBAMA)

SEI/IBAMA - 8536447 - Abio (Retificação)

file:///C:/Users/ZC2D/AppData/Local/Microsoft/Windows/Temporary ...



INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

AUTORIZAÇÃO DE CAPTURA, COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO - Abio (Retificação)
Nº 640/2015 - 1ª Renovação - 2ª Retificação (8536447)

VALIDADE : 18/08/2022



Documento assinado eletronicamente por JONATAS SOUZA DA TRINDADE, Diretor, em 09/10/2020, às 17:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ibama.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador 8536447 e o código CRC E0D8D738.

A DIRETORIA DE LICENCIAMENTO AMBIENTAL DO INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA, no uso das atribuições que lhe conferem o art. 77 do Anexo I da Portaria 14 de 29 de junho de 2017, que aprovou a Estrutura Regimental do IBAMA, publicado no Diário Oficial da União de 30 de junho de 2017, e o Art. 1º da Portaria Nº 12, de 05 de agosto 2011, que atribui à DILIC a competência para emitir autorizações de captura, coleta e transporte de material biológico, **RESOLVE**:

Expedir a presente Autorização de Captura, Coleta e Transporte de Material Biológico à/ao:

EMPREENDEDOR: Petróleo Brasileiro S.A. - Unidade de Negócios de Exploração e Produção da Bacia de Santos (UN-BS)

CNPJ: 33.000.167/0895-01

ENDEREÇO: Rua Marquês de Herval, 90

BAIRRO: Valongo **CIDADE:** Santos **UF:** SP **CEP:** 11010-310

TELEFONE: (13) 3249-7700

Número do Processo: 02001.114275/2017-00

Referente aos empreendimentos desenvolvidos pela empresa na Bacia de Santos, como **Atividade de Produção e escoamento de Petróleo e Gás Natural do Polo Pré-Sal da Bacia de Santos - Etapa 2** (Processo nº 02022.002141/2011-03), **Teste de Longa Duração (TLD) e Sistemas de Produção Antecipada de Libra - Bacia de Santos** (Processo nº 02022.000330/2014-86) e **Atividade de perfuração e complementação de poços dentro da Área Geográfica da Bacia de Santos** (Processo nº 02022.003032/2005-57).

RESPONSÁVEL TÉCNICO: Fernando Gonçalves de Almeida

CTF: 1522510

Relativa às atividades de *Monitoramento e Resgate/Soltura de fauna aquática do Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS), trechos 1 a 6 (SC e PR)*, necessárias aos processos de licenciamento ambiental em epígrafe.

Esta Autorização de Captura, Coleta e Transporte de Material Biológico é vinculada ao processo de licenciamento ambiental federal supracitado e ao Processo 02001.114275/2017-00, observadas as condições discriminadas neste documento e nos demais anexos constantes do processo que, embora aqui não transcritos, são partes integrantes deste licenciamento.

A validade desta autorização está condicionada ao fiel cumprimento de suas condicionantes e da apresentação da Relação de Equipe Técnica (RET) válida.

1. CONDIÇÕES GERAIS

1.1. Esta autorização não permite:

- Captura/coleta/transporte/soltura de material biológico sem a presença de um dos técnicos listados na relação da equipe técnica (RET).
- Captura/coleta/transporte/soltura de espécies em unidades de conservação federais, estaduais, distritais ou municipais, salvo quando acompanhadas da anuência do órgão administrador competente;
- Captura/coleta/transporte/soltura de espécies em área particular sem o consentimento do proprietário;
- Exportação de material biológico;

e) Acesso ao patrimônio genético, nos termos da regulamentação constante na Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015;

f) Captura/coleta no interior de cavidades naturais, salvo se previsto nesta autorização.

1.2. Esta autorização é válida somente sem emendas e/ou rasuras.

1.3. O Ibama, mediante decisão motivada, poderá modificar as condicionantes, bem como suspender ou cancelar esta autorização.

1.4. A ocorrência de violação ou inadequação de quaisquer condicionantes ou normas legais, bem como omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a emissão da autorização sujeita os responsáveis, incluindo a equipe técnica, à aplicação de sanções previstas na legislação pertinente.

1.5. O pedido de renovação deverá ser protocolado no mínimo 60 (sessenta) dias antes de expirar o prazo de validade desta autorização.

1.6. O início das atividades e/ou de cada campanha deverá ser informado previamente à Dilic, de modo a possibilitar o acompanhamento destas por técnicos do Ibama.

1.7. A equipe técnica deve portar esta autorização (incluindo a Relação da Equipe Técnica) em todos os procedimentos de captura/coleta/transporte/soltura.

1.8. Quaisquer alterações necessárias nesta Autorização e/ou referentes ao Plano de Trabalho (equipes, pontos amostrais, metodologias, etc) devem ser solicitadas e aprovadas previamente pelo Ibama;

1.9. Espécime de fauna silvestre exótica não poderá, sob hipótese alguma, ser destinado para retorno imediato à natureza ou à soltura.

1.10. Deverão ser apresentadas as cartas de recebimento das instituições depositárias contendo a lista das espécies e a quantidade dos animais recebidos. Tão logo seja feito o tombamento destes espécimes, o número de tomo deverá ser informado.

1.11. Todos os envolvidos nas atividades devem manter o Cadastro Técnico Federal – CTF regular durante o tempo de vigência desta Autorização.

1.12. O Ibama deverá ser comunicado do término da atividade, com a apresentação, no prazo máximo de 30 (trinta) dias após a conclusão das atividades, do Relatório de Atendimento de Condicionantes, seguindo modelo estabelecido em normativa vigente.

1.13. Todos os produtos gerados com os dados oriundos das atividades aqui descritas – artigos, teses e dissertações, dentre outras formas de divulgação – deverão contextualizar sua origem como exigência do processo de licenciamento ambiental federal ao qual se referem.

2. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS:

2.1. As atividades deverão ser executadas pelas Consultorias cujos dados constam abaixo:

CONSULTORIA OU CONSULTOR AUTÔNOMO RESPONSÁVEL PELA ATIVIDADE: Univali – Universidade do Vale do Itajaí

CNPJ/CPF: 84.307.974/0001-02

COORDENADOR GERAL DA ATIVIDADE: André Silva Barreto

CPF: 012.039.747-10

TELEFONE DE CONTATO/ E-MAIL: (47) 3341-7960 / abarreto@univali.br

2.2. A captura/coleta/soltura de material biológico deverá ocorrer nas *Áreas Amostrais* relacionadas na lista abaixo, de acordo com o Projeto Executivo aprovado pelo Ibama:

Área, Módulo ou Ponto Amostral	Coordenadas Geográficas – Datum SIRGAS	Município/Estado
Litoral do município de Laguna, praia do Mar Grosso até o município de Guaraqueçaba, no limite norte costeiro da Ilha do Superagui.	Início: 48°45'41,56"O 28°29'48,83"S Final: 48°06'19,80"O 25°19'20,80"S	Laguna/SC a Guaraqueçaba/PR

2.3. As atividades permitidas por esta autorização são:

GRUPOS TAXONÔMICOS: Quelônios, aves e mamíferos marinhos

DESCRIÇÃO DA ATIVIDADE: Registro e coleta de animais marinhos encontrados mortos na área amostral; registro e atendimento veterinário de animais marinhos encontrados vivos na área amostral; transporte dos animais vivos e carcaças para as instituições listadas nos itens 2.6 e 2.7 desta Autorização; demais atividades conforme aprovadas no Projeto Executivo Integrado do PMP-BS.

PETRECHOS: O monitoramento será realizado utilizando diversos tipos de veículos (caminhonetes, quadriciclos, motocicletas, bicicletas, embarcações) ou a pé, de acordo com a natureza da praia. Dependendo da natureza do material encontrado, serão utilizados petrechos diferentes para lidar com os organismos. Animais mortos: EPI para a equipe (luvas descartáveis, máscaras, calçado fechado, óculos de proteção). Animais vivos: Puçás, redes, malhas, gaiolas, caixas de transporte adequadas ao grupo

taxonômico, cambão (para pinípedes de maior porte), EPI (luvas de raspa de couro, óculos de proteção, máscaras, calçado fechado) e outros equipamentos de proteção e para a captura dos animais, conforme Projeto Executivo aprovado.

MARCAÇÃO: Anilhas do Centro Tamar/ICMBio para quelônios marinhos; anilhas do SNA/Cemave para aves marinhas; materiais recomendados pelo CMA/ICMBio para mamíferos marinhos.

2.4. Deverão ser utilizadas as metodologias apresentadas no Projeto Executivo Integrado do PMP-BS (SEI nº 4720859), aprovadas no Parecer Técnico nº 180/2019-COPROD/CGMAC/DILIC (SEI nº 5188360).

2.5. Não são autorizadas coletas de quaisquer indivíduos apenas para identificação.

2.6. Os espécimes coletados deverão ser depositados em uma das Instituições abaixo mencionadas, para as quais fica permitido o Transporte de Material Biológico.

INSTITUIÇÃO DESTINATÁRIA: Museu Oceanográfico Univali

ENDEREÇO: Avenida Sambaqui, 318, Santo Antônio, Balneário Piçarras/SC (às margens da BR 101). CEP

TELEFONE DE CONTATO/ E-MAIL: (47) 3261-1287 / soto@univali.br

INSTITUIÇÃO DESTINATÁRIA: Acervo Biológico Iperoba - Univille

ENDEREÇO: Rodovia Duque de Caxias, 6.365 - Poste 128, km 8, Iperoba, São Francisco do Sul/SC. CEP 89240-000

TELEFONE DE CONTATO/ E-MAIL: (47) 3471-3816 / marta.cremer@univille.br

INSTITUIÇÃO DESTINATÁRIA: Museu de Ciências Naturais da Universidade Federal do Paraná

ENDEREÇO: Av. Cel. Francisco H. dos Santos, s/n, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba/PR. CEP 81530-000

TELEFONE DE CONTATO/ E-MAIL: (41) 3361-1628 / camila.lec@ufpr.br

INSTITUIÇÃO DESTINATÁRIA: Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres - Cemave/ICMBio

ENDEREÇO: BR 230 Km 10, Floresta Nacional da Restinga de Cabedelo, Cabedelo/PB. CEP 58.108-012

TELEFONE DE CONTATO/ E-MAIL: (48) 3282-2617 / patricia.serafini@icmbio.gov.br

INSTITUIÇÃO DESTINATÁRIA: Laboratório de Mamíferos Aquáticos da Universidade Federal de Santa Catarina (Lamaq/UFSC)

ENDEREÇO: Departamento de Ecologia e Zoologia, Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário Trindade, Florianópolis/SC. Caixa Postal 5102. CEP 88040-970

TELEFONE DE CONTATO/ E-MAIL: (48) 3721-7150 / lamaqsl@ccb.ufsc.br

INSTITUIÇÃO DESTINATÁRIA: Laboratório de Ornitologia e Bioacústica Catarinense da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

ENDEREÇO: Rua Roberto Sampaio Gonzaga, 274, Departamento de Ecologia e Zoologia, Centro de Ciências Biológicas, Trindade, Florianópolis/SC. CEP 88040-380

TELEFONE DE CONTATO/ E-MAIL: (48) 3721-4746 / grenzobrito@gmail.com

2.7. Os indivíduos resgatados com vida serão transferidos para tratamento e reabilitação em uma das Instituições abaixo mencionadas, que poderão realizar necrópsias e outros exames em animais encontrados mortos, ou que venham a óbito durante o tratamento, e para as quais fica permitido o Transporte de Material Biológico:

INSTITUIÇÃO DESTINATÁRIA: Instituto Australis

ENDEREÇO: Av. Atlântica s/n, Itapiruba Norte, Imbituba/SC. Caixa Postal 201. CEP 88780-000

TELEFONE DE CONTATO/ E-MAIL: (48) 3255-2922 / (48) 99919-4400 / karina@institutoaustralis.org.br

INSTITUIÇÃO DESTINATÁRIA: Associação R3 Animal

ENDEREÇO: Rod. João Gualberto Soares s/n, Parque Estadual Rio Vermelho, Florianópolis/SC. CEP 88058-300

TELEFONE DE CONTATO/ E-MAIL: (48) 3018-2316 / (48) 99911-6866 / crystiane@r3animal.org

INSTITUIÇÃO DESTINATÁRIA: Tamar Santa Catarina

ENDEREÇO: Rua Professor Ademir Francisco, 01, Barra da Lagoa, Florianópolis/SC. CEP 88061160

TELEFONE DE CONTATO/ E-MAIL: (48) 3236-2015 / (48) 9149-7428 / ju@tamar.org.br

INSTITUIÇÃO DESTINATÁRIA: Universidade do Estado de Santa Catarina - Udesc

ENDEREÇO: Av. Colombo Machado Salles s/n, Laguna Internacional/Praia do Gi, Laguna/SC. CEP 88790-000

TELEFONE DE CONTATO/ E-MAIL: (48) 3647-7930 / (48) 3647-7928 / pedro.castilho@udesc.br

INSTITUIÇÃO DESTINATÁRIA: Universidade Federal do Paraná - UFPR

ENDEREÇO: Av. Beira mar, s/n, Pontal do Sul, Pontal do Paraná/PR. CEP 83255-976

TELEFONE DE CONTATO/ E-MAIL: (41) 3511-8616 / (41) 3511-8671 / cadomit@gmail.com

INSTITUIÇÃO DESTINATÁRIA: Universidade do Vale do Itajaí (Unidade de Penha) - Univali

ENDEREÇO: Rua Maria Emilia de Costa, 90, Armação, Penha/SC. CEP 88385-000

TELEFONE DE CONTATO/ E-MAIL: (47) 3341-5599 / (47) 99114-9235 / jdick@univali.br

INSTITUIÇÃO DESTINATÁRIA: Universidade da Região de Joinville - Univille

ENDEREÇO: Rodovia Duque de Caxias, 6.365, km 8, Poste 128, Iperoba, São Francisco do Sul/SC. CEP 89240-000

TELEFONE DE CONTATO/ E-MAIL: (47) 3471-3816 / (47) 3471-3805 / jenyffer.vieira@univille.br

2.8. Após a necrópsia e definição de *causa mortis*, o material biológico que não for de interesse das Instituições referidas nos itens 2.6 e 2.7 deverá ser descartado conforme as normas sanitárias específicas vigentes.

2.9. Carcaças maiores de três metros de comprimento, ou pesando mais de 100 kg, poderão ser necropsiadas na praia e a carcaça posteriormente enterrada, de acordo com procedimentos aprovados pelo Ibama e pelo órgão ambiental estadual e autorizados pelo poder público local.

2.10. Para as atividades executadas na área interna ou adjacências do Parque Nacional do Superagui (Ilhas das Peças e do Superagui) será dada preferência a realização de necrópsias na praia, conforme documentação constante no Processo nº 02001.114275/2017-00. Sempre que levadas à base para necrópsia, as carcaças deverão ser posteriormente retornadas à região de retirada para que não seja alterado o ciclo e dinâmica natural de cadeia trófica das praias da região.

2.11. Procedimentos de eutanásia devem ser indicados e realizados por Médico Veterinário em conformidade com os métodos recomendados e demais exigências do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

2.12. A prioridade de destinação dos animais resgatados deve ser a soltura. Animais reabilitados, porém não aptos a serem soltos, inclusive o disposto na condicionante 1.9 desta Autorização, deverão ser destinados conforme orientação do órgão ambiental competente no Estado de origem do animal, após emissão de laudo veterinário justificando a impossibilidade de soltura do exemplar. Toda documentação deverá ser encaminhada ao Ibama, que dará ciência e apresentará manifestação, quando pertinente.

2.13. A contenção química dos animais será realizada apenas em último caso e por Médico Veterinário devidamente qualificado. Nas situações em que esta contenção for necessária, todas as providências tomadas deverão ser informadas no âmbito dos relatórios a serem encaminhados ao Ibama.

2.14. No caso de animais encontrados contaminados por óleo deverão ser observados os procedimentos previstos no "[Manual de boas práticas - Manejo de fauna atingida por óleo](#)", disponível no portal www.gov.br/ibama.

2.15. Os espécimes coletados ou capturados sob esta Autorização não poderão ser comercializados.

2.16. Esta Autorização é válida somente para o atendimento dos objetivos e desenvolvimento das atividades previstas no Projeto aprovado no âmbito do Processo indicado neste documento, sendo vedado seu uso para outras atividades.

SEI nº 8536447