

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

TESE

AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E
PESQUISA DE HEMOPARASITOS DO GÊNERO *Hepatozoon* EM
URUBUS-PRETO (*Coragyps atratus*)

Naiara Vidal Stocco

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E
PESQUISA DE HEMOPARASITOS DO GÊNERO *Hepatozoon* EM
URUBUS-PRETO (*Coragyps atratus*)**

NAIARA VIDAL STOCCO

Sob a Orientação da Professora:
Cristiane Divan Baldani

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor**, no
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária - Patologia e
Ciências Clínicas, Área de Concentração
em Patologia Animal

Seropédica, RJ
Março de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S864a Stocco, Naiara Vidal, 1993-
Avaliação Hematológica e Pesquisa de Hemoparasitos
do Gênero Hepatozoon em Urubus-preto (*Coragyps*
atratus). / Naiara Vidal Stocco. - Seropédica, 2024.
64 f.

Orientador: Cristiane Divan Baldani.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Medicina
Veterinária Patologia e Ciências Clínicas, 2024.

1. Hematozoários. 2. Diagnóstico molecular. 3.
Medula óssea. 4. Cathartidae. I. Baldani, Cristiane
Divan, 1978-, orient. II Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária Patologia e Ciências Clínicas
III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

NAIARA VIDAL STOCCO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Patologia Animal.

TESE APROVADA EM 01/04/2024

Cristiane Divan Baldani. Dra. UFRRJ
(orientadora)

Daniel de Almeida Balthazar. Dr. UFRRJ

Huarrisson Azevedo Santos. Dr. UFRRJ

Aline Moreira de Souza. Dra. UFF

Carina Franciscato. Dra. UFJF



TERMO Nº 213/2024 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 04/04/2024 17:04)

CRISTIANE DIVAN BALDANI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)
Matrícula: ###724##0

(Assinado digitalmente em 04/04/2024 17:04)

DANIEL DE ALMEIDA BALTHAZAR
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)
Matrícula: ###187##3

(Assinado digitalmente em 06/04/2024 07:42)

HUARRISSON AZEVEDO SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: ###014##2

(Assinado digitalmente em 06/04/2024 00:03)

ALINE MOREIRA DE SOUZA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###,###,317-##

(Assinado digitalmente em 05/04/2024 07:56)

CARINA FRANCISCATO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###,###,410-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **213**, ano: **2024**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **04/04/2024** e o código de verificação: **053fb28703**

AGRADECIMENTOS

À Deus por me sustentar até aqui, me mantendo forte, com saúde e esperançosa. Esses últimos meses foram muito difíceis, por diversas vezes achei que não fosse conseguir, mas Deus sempre esteve ao meu lado renovando minha fé.

À minha família, vocês são minha força. À minha mãe, guerreira, que sempre me incentivou ir atrás dos meus objetivos e não desistir diante das adversidades, saiba que sem o seu apoio eu não teria conseguido conquistar os meus sonhos e me tornando quem sou. Agradeço ao meu pai por todo apoio. À minha irmã, minha metade, obrigada por todo companheirismo, por ter me aguentado nesses últimos meses de estresse, sempre me apoiando e incentivando a continuar forte e otimista. Saiba que meus dias sem você serão muito difíceis, mas agradeço muito a Deus por ter me dado uma companheira de vida, graças a você nunca soube o que é estar sozinha e sei que mesmo distante sempre teremos uma à outra. Além disso, você foi a grande responsável por toda minha coleta, quem organizou tudo e idealizou a utilização dos urubus, minha Tese não teria resultados sem você, muito obrigada. Agradeço também aos meus outros irmãos, Lucas e Alice. Amo muito vocês.

À professora Cristiane Divan Baldani, minha orientadora, a responsável por tudo. Foi você quem me incentivou a adiantar o mestrado e ingressar no doutorado (através do edital extraordinário) e foi graças a isso, que tive a oportunidade de me inscrever no concurso e ser aprovada. Agradeço por sempre acreditar em mim, me instruir e orientar, sem todo o ensinamento e preparação durante esses últimos 7 anos não teria conseguido alcançar esse sonho. Sou muito grata pela amizade, preocupação, oportunidade de evoluir e aprender.

Aos meus amigos do LABVET, meu grupinho, Ágatha, Lex e Beth. Recentemente fomos comparados a um coágulo e, não poderia existir analogia melhor pra definir nossa parceria. Sou muito grata por saber que sempre posso contar com vocês, agradeço por todo apoio, ajuda e companheirismo, saibam que sempre poderão contar comigo, mesmo de longe. Amo vocês.

Agradeço também a toda equipe LABVET que fizeram parte do meu crescimento pessoal e profissional. A Bia nossa eterna IC, a melhor. Aos demais residentes, as técnicas e professora Andresa e Carlos Henrique, obrigada por tudo.

Ao professor Daniel de Almeida Balthazar, que sempre me ajudou desde a graduação. Agradeço por toda ajuda durante as coletas de sangue, desde meu projeto de residência até o doutorado. Obrigada por tudo, por todo incentivo e por acreditar em mim.

Ao professor Huarrinson, por toda ajuda e orientações relacionadas ao diagnóstico molecular, por disponibilizar a utilização do LASAVE e a toda equipe de discentes de pós-graduação e técnico que sempre me auxiliaram e me receberam muito bem.

Agradeço Também ao CETAS e todo a equipe, que autorizou a utilização dos animais para a realização do estudo.

À secretária do PPGMV, Isabelle, peço desculpa por sempre mandar mensagem pedindo ajuda ou favor. Obrigada por estar sempre disposta a ajudar todos os alunos e professores, você é um exemplo de profissional.

Aos professores membros da Banca de Defesa pela disponibilidade, por aceitarem o convite, assim como auxílio na correção deste trabalho e sugestões.

Pra finalizar, agradeço a Rural! Aqui começa minha despedida a esse lugar tão importante. Se fosse definir a Rural em uma palavra, essa palavra seria casa, onde conheci pessoas incríveis de várias partes do Brasil, cresci pessoalmente e profissionalmente, evolui e amadureci. Foi a Rural responsável por apresentar todos os profissionais que me formaram

como Médica Veterinária, por me proporcionar viver tantas oportunidades e por permitir conquistar o meu sonho, sonho este que parecia distante, mas chegou antes que desse conta! Me despeço, mas sempre que der voltarei pra matar as saudades.

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

RESUMO

STOCCO, Naiara Vidal. **Avaliação Hematológica e Pesquisa de Hemoparasitos do Gênero *Hepatozoon* em Urubus-preto (*Coragyps atratus*)**. 2024. 51p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Coragyps atratus é uma espécie de abutre do Novo Mundo pertencente à Ordem Cathartiformes, responsável por desempenhar importante papel ecológico como saneadores ambientais, eliminando matérias orgânicas em decomposição. Entretanto, tais hábitos também podem favorecer a atuação destes indivíduos como importantes reservatórios de agentes patogênicos. Portanto, rastrear agentes de importância médico-veterinária, como os hemoparasitos, pode auxiliar no entendimento das interações parasito-hospedeiro e, prevenir a propagação destes patógenos entre espécies suscetíveis. O objetivo do presente estudo foi realizar avaliação hematológica e pesquisa de hemoparasitos do gênero *Hepatozoon* em Urubus-preto (*Coragyps atratus*), através de observação direta sob microscopia de luz e biologia molecular com base no gene 18S rRNA em indivíduos amostrados do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), Seropédica-RJ. Vinte urubus-preto originados de resgate foram atendidas no Hospital Veterinário de Pequenos Animais (HHPA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e amostradas neste estudo. Ao término do exame clínico, todas as aves foram submetidas a colheita de sangue, via veia ulnar e, a partir do sangue total, foram realizadas a avaliação hematológica, pesquisa de hematozoários via esfregaço sanguíneo e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Cinco desses animais apresentaram sinais clínicos inespecíficos (prostração e anorexia), sendo submetidos também a colheita de medula óssea para uma avaliação mais minuciosa. As cinco amostras de medula óssea pareadas ao sangue foram submetidas ao diagnóstico molecular. Na microscopia direta quatro aves (20%) apresentaram inclusões no interior dos leucócitos no sangue total, onde os gametócitos intraleucocitários foram sugestivos do gênero *Hepatozoon*. No diagnóstico molecular, 11 urubus (55%) foram positivos para *Hepatozoon* com base no gene 18S rRNA, diante das amostras obtidas do sangue total. Além disso, 3 (3/5; 60%) urubus foram positivos apenas nas amostras obtidas da medula óssea, apresentando ocorrência global de 14 aves positivas (14/20; 70%) mediante aos dois métodos amostrais (coleta sangue total e medula óssea) na PCR. Quanto aos resultados do hemograma, os valores médios observados entre indivíduos positivos e negativos não apresentarem alterações discrepantes. No entanto, quando analisados individualmente algumas alterações foram observadas para o grupo de animais positivos. Pelo menos 2/14 urubus apresentaram hematócrito abaixo do intervalo de referência para espécie (n=2; 14%; urubu 98 e 102). Um apresentou eritrocitose (urubu 100). 5/14 (36%; urubus 95, 100, 102, 109, 110 e 113) manifestaram eosinofilia e 8/14 apresentaram hiperproteinemia. Os demais parâmetros não diferiram da literatura. Os resultados obtidos revelaram a ocorrência de 70% de *Hepatozoon* sp. em urubus-preto mantidos no CETAS do Rio de Janeiro, alertando sobre o risco de transmissão entre os indivíduos mantidos nestas instituições e a importância de implementação de métodos diagnósticos. Ademais, os resultados oferecem oportunidades para pesquisas futuras, direcionadas as consequências, prevalência e diversidade do gênero *Hepatozoon* em abutres do novo mundo.

Palavras-chave: Hematozoários, diagnóstico molecular, medula óssea, Cathartidae

ABSTRACT

STOCCO, Naiara Vidal. **Hematological Evaluation and Research of Hemoparasites of the Genus *Hepatozoon* in Black Vultures (*Coragyps atratus*)**. 2024. 51p. Thesis (Doctorate in Veterinary Medicine). Veterinary Institute, Graduate Program in Veterinary Medicine - Pathology and Clinical Sciences, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Coragyps atratus is a species of New World vulture belonging to the Order Cathartiformes, responsible for playing an important ecological role as environmental sanitizers, eliminating decomposing organic matter. However, such habits can also favor the role of these individuals as important reservoirs of pathogenic agents. Therefore, tracking agents of medical and veterinary importance, such as hemoparasites, can help to understand parasite-host interactions and prevent the spread of these pathogens between susceptible species. The objective of the present study was to carry out hematological evaluation and research on hemoparasites of the genus *Hepatozoon* in Black Vultures (*Coragyps atratus*), through direct observation under light microscopy and molecular biology based on the 18S rRNA gene in individuals sampled from the Animal Screening Center. Wild Animals (CETAS), Seropédica-RJ. Twenty rescued black vultures were treated at the Small Animal Veterinary Hospital (HVPA) of the Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ) and sampled in this study. At the end of the clinical examination, all birds underwent blood collection via the ulnar vein and, from the whole blood, hematological evaluation, hematozoa research via blood smear and Polymerase Chain Reaction (PCR) were carried out. Five of these animals showed non-specific clinical signs (prostration and anorexia), and were also subjected to bone marrow collection for a more detailed evaluation. The five blood-matched bone marrow samples were subjected to molecular diagnosis. In direct microscopy, four birds (20%) showed inclusions within leukocytes in whole blood, where intraleukocyte gametocytes were suggestive of the *Hepatozoon* genus. In the molecular diagnosis, 11 vultures (55%) were positive for *Hepatozoon* based on the 18S rRNA gene, based on samples obtained from whole blood. Furthermore, 3 (3/5; 60%) vultures were positive only in samples obtained from bone marrow, with an overall occurrence of 14 positive birds (14/20; 70%) using both sampling methods (whole blood and bone marrow collection) in PCR. Regarding the blood count results, the average values observed between positive and negative individuals did not present discrepant changes. However, when analyzed individually, some changes were observed for the group of positive animals. At least 2/14 vultures had hematocrit below the reference range for the species (n=2; 14%; vulture 98 and 102). One presented erythrocytosis (vulture 100). 5/14 (36%; vultures 95, 100, 102, 109, 110 and 113) showed eosinophilia and 8/14 showed hyperproteinemia. The other parameters did not differ from the literature. The results obtained revealed the occurrence of 70% of *Hepatozoon* sp. in black vultures kept at CETAS in Rio de Janeiro, warning about the risk of transmission between individuals kept in these institutions and the importance of implementing diagnostic methods. Furthermore, the results offer opportunities for future research, aimed at the consequences, prevalence and diversity of the *Hepatozoon* genus in New World vultures.

Keywords: Hematozoa, molecular diagnosis, bone marrow, Cathartidae

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Espécies de <i>Hepatozoon</i> aviário	10
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática sobre avaliação da condição corporal através do sistema de pontuação da musculatura peitoral com relação sua projeção a quilha (escore 1 a 5). Fonte: Grespan; Raso (2014)	13
Figura 2. Colheita de sangue em região da asa, veia ulnar em Urubu-preto (<i>Coragyps atratus</i>), CETAS – Seropédica – RJ, 2023.....	14
Figura 3. (a) Aplicação bloqueio local com lidocaína. (b) e (c) região proximal a articulação femorotibiopatelar, acesso intraósseo em região epifisária da tíbia. (d) agulha tipo Rosenthal fixada ao osso e aspiração do conteúdo medular. Seropédica, 2023	15
Figura 4. Parte do aspirado medular de urubu (<i>Coragyps atratus</i>) depositado em placa de Petri para colheita de espículas e confecção do esfregaço. LABVET, Seropédica, 2023.	16
Figura 5. Confecção esfregaço por método de squash com aspirado de medula óssea de urubu (<i>Coragyps atratus</i>) para pesquisa de hemoparasitos em medula óssea. LABVET, Seropédica, 2023.	16
Figura 6. Câmara de Neubauer: retículo de eritrócitos (quadrante central) contagem de trombócitos (toda área destacada em preto), parte destacada em vermelho relacionada a contagem de eritrócitos; Quadrantes laterais, destacado em azul, região de contagem de leucócitos. LABVET, Seropédica, 2023	17
Figura 7. Extração de DNA de amostra de sangue total e medula óssea de urubu (<i>Coragyps atratus</i>) em fluxo separado. LABVET, Seropédica, 2023.....	18
Figura 8. Produtos da PCR adicionados em gel de agarose para realização da eletroforese. Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE), UFRRJ. Seropédica, 2023.	20
Figura 9. <i>Hepatozoon</i> sp.(seta) em esfregaço sanguíneo de Urubu espécie <i>Coragyps atratus</i> . (a) Gamonte no citoplasma de um monócito. (b) Deslocamento do núcleo de leucócito pelo gamonte. (c) Gamonte em citoplasma de linfócito. (d) Gamonte formato mais robusto no interior de um leucócito mononuclear. Coloração: Giemsa. Aumento 1000x. LABVET, Seropédica, 2023.	23
Figura 10. Esfregaço sanguíneo de Urubu espécie <i>Coragyps atratus</i> . Gamonte de <i>Hepatozoon</i> sp. (seta) observado em célula rompida, impossibilitando identificação do tipo celular. Coloração: Giemsa. Aumento 1000x. LABVET, Seropédica, 2023.	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores e condições de termociclagem para o controle da extração de DNA (gene endógeno) e detecção molecular de <i>Hepatozoon</i> sp. baseadas na sequência 18S rRNA	19
Tabela 2. Análise Estatística Descritiva dos parâmetros clínicos (peso, temperatura e escore corporal) de Urubus-preto (<i>Coragyps atratus</i>) negativos e positivos para <i>Hepatozoon</i> sp. LABVET - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.	21
Tabela 3. Presença ou ausência de inclusões em esfregaço sanguíneo, sugestivos de <i>Hepatozoon</i> sp. em Urubus-preto (<i>Coragyps atratus</i>), CETAS, Seropédica/RJ	22
Tabela 4. Resultados positivos em reações de PCR com base no gene 18S rRNA para agentes do gênero <i>Hepatozoon</i> obtidos de amostras de DNA extraídas de sangue total e medula em Urubus-preto (<i>Coragyps atratus</i>). CETAS, Seropédica/RJ	25
Tabela 5. Análise Estatística Descritiva dos parâmetros hematológicos de Urubus-preto (<i>Coragyps atratus</i>) negativos e positivos para <i>Hepatozoon</i> sp. LABVET - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.	26
Tabela 6. Parâmetros hematológicos e proteína plasmática total de urubus-preto (<i>Coragyps atratus</i>) (94 a 101) positivos para <i>Hepatozoon</i> sp. Seropédica 2023.	27
Tabela 7. Parâmetros hematológicos e proteína plasmática total de urubus-preto (<i>Coragyps atratus</i>) (102 a 113) positivos para <i>Hepatozoon</i> sp. Seropédica, 2023	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Ordem Cathartiformes	2
2.2 <i>Coragyps atratus</i> (Bechstein, 1793).....	3
2.3 Coleta e Processamento das Amostras Sanguíneas	4
2.4 Interpretação das Análises Laboratoriais.....	5
2.5 Parasitismo em Aves	6
2.6 Gênero <i>Hepatozoon</i>	7
2.6.1 Ciclo de vida.....	8
2.6.2 <i>Hepatozoon</i> sp. no hospedeiro aviário	9
2.6.3 Diagnóstico.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Autorização para Pesquisa com Animais Silvestres.....	12
3.2 Animais.....	12
3.3 Exame Clínico das Aves.....	12
3.4 Colheita de Sangue	13
3.5 Colheita da medula	14
3.6 Hemograma	17
3.7 Extração de DNA	18
3.8 PCR Convencional	18
3.8.1 Reação gene endógeno Beta actina	19
3.8.2 Reações de amplificação para <i>Hepatozoon</i> baseado no gene 18S rRNA.....	19
3.8.3 Controle das reações	19
3.8.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose	20
3.9 Análise Estatística	20
4 RESULTADOS	21
4.1 Exame Clínico	21
4.2 Avaliação dos Esfregaços Sanguíneos	21
4.3 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR)	24
4.4 Análise Hematológica Urubus-preto (<i>Coragyps atratus</i>).....	25
5 DISCUSSÃO.....	28
6 CONCLUSÃO.....	31
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXO	48
A- Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO	48

1 INTRODUÇÃO

O crescimento exponencial da população humana somado a consequente invasão ao habitat da vida selvagem aumentou a frequência e a intensidade das interações entre indivíduos selvagens e seres humanos, proporcionando surgimento e adaptações de uma variedade de patógenos. A mortalidade de animais selvagens está atribuída a uma série de fatores, incluindo predação, senescência, desnutrição, acidentes, desastres naturais, doenças e ações antrópicas.

Os abutres do Novo Mundo, urubus e condores, representam importante papel no controle de doenças devido seu hábito necrófago, responsáveis por cumprirem funções ecológicas como saneadores ambientais, eliminando matérias orgânicas em decomposição. Desempenhando papel notável no funcionamento dos ecossistemas, especialmente ao forragear animais mortos, promovendo limpeza dos ambientes onde vivem, prevenindo propagação de doenças entre os diferentes níveis tróficos.

Entretanto, as populações destes indivíduos vêm sofrendo declínios vertiginosos por diversas causas antrópicas. Além disso, o hábito alimentar (depósito de lixo, carcaça de animais advindas tanto do ambiente urbano, quanto ambiente rural ou silvestre) pode favorecer seu contato com inúmeros patógenos. Portanto, rastrear tais agentes pode auxiliar no entendimento das interações parasito-hospedeiro e, prevenir propagação de linhagens altamente patogênicas e potencialmente zoonóticas, capazes de afetar tanto a conservação dessas espécies, quanto a da saúde humana.

Os Centros de Triagem do IBAMA, albergam considerável número de aves de diversas espécies. Estes indivíduos advêm de apreensão, resgate ou criação ilegal e chegam constantemente debilitados nestas instituições, estando propensos a doenças. Logo, a realização de testes diagnósticos neste meio é de suma importância, dado o papel destas instituições frente a realocação ou reintrodução de animais silvestres à natureza, além de favorecer interações interespecies, ambiente ideal à transmissão de uma variedade de patógenos.

Infecções parasitárias em animais de vida livre ou de ambientes não antropizados costumam acarretar alterações clínicas pouco significativas. No entanto, parasitoses intensas podem estar associadas a animais imunocomprometidos, frequentemente observado em indivíduos provenientes de apreensões e resgate.

Uma variedade de hemoparasitos acometendo aves já foram descritos em inúmeras literaturas. No entanto, pouco se sabe sobre a patogenicidade do *Hepatozoon* nesta classe. Espécies desse gênero são parasitos sanguíneos intracelulares cosmopolitas transmitidos por artrópodes de vertebrados terrestres.

Diversas espécies do gênero *Hepatozoon* foram relatadas em anfíbios, répteis e mamíferos, porém em menor descrição em aves. Os ciclos de vida completos são desconhecidos para qualquer uma das espécies aviárias de *Hepatozoon*. Em geral, a transmissão consiste na ingestão do invertebrado infectado. Em alguns casos, os vertebrados também podem funcionar como hospedeiros intermediários e infectar predadores quando consumidos, motivação pela qual optou-se desenvolver o atual estudo voltado a infecções por *Hepatozoon* em urubus, uma vez que seus hábitos alimentares podem favorecer infecções por este gênero.

Até o presente momento não há relatos na literatura que investiguem a ocorrência de hemoparasitos do gênero *Hepatozoon* em abutres do novo mundo, comumente conhecidos como urubus e condores, cuja distribuição geográfica é exclusiva do continente americano.

O objetivo do presente estudo foi realizar a avaliação hematológica e pesquisa de hemoparasitos do gênero *Hepatozoon* em Urubus-preto (*Coragyps atratus*), através de observação direta em microscopia de luz e biologia molecular com base no gene 18S rRNA de

aves da Família Cathartidae amostradas do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), Seropédica-RJ.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ordem Cathartiformes

A Ordem Cathartiformes é constituída pela Família Cathartidae, representada pelos abutres do Novo Mundo, comumente conhecidos como urubus e condores, cuja distribuição geográfica é exclusiva do continente americano. São reconhecidas sete espécies atuais, distribuídas em cinco gêneros, sendo quatro deles monotípicos (*Cathartes aura*, *Cathartes burrovianus*, *Cathartes melambrotus*, *Coragyps atratus*, *Sarcoramphus papa*, *Vultur gryphus* e *Gymnogyps californianus*) (Houston, 1994; Sick, 1997; Márquez et al., 2005).

A família Cathartidae é representada por aves de médio a grande porte (56-134 cm / 850g – 15kg) que possuem várias adaptações anatômicas e fisiológicas associadas à sua dieta. Acredita-se que todas as espécies de urubus possuam um olfato superior ao das demais aves, sendo mais altamente desenvolvido em *Cathartes aura*, urubu-de-cabeça-vermelha, espécie capaz de encontrar carcaças escondidas no interior de matas fechadas (Houston, 1986; McShea et al., 2000). Do mesmo modo, a visão é aguçada em todas as espécies (Bang et al., 1964; McShea et al., 2000). As narinas são vazadas, bicos e pés fortes utilizados na dilaceração de carcaças, e a cabeça e o pescoço são desprovidos, total ou parcialmente, de penas o que evita o acúmulo de matéria orgânica em decomposição nestas regiões, e espesso colar de penas no pescoço, o que evita a passagem de líquidos provenientes da dieta às outras partes do corpo (Sick 1997; Fergusson-Lee; Christie, 2001).

Por serem consumidores de carne em putrefação essas aves desempenham importante papel ecológico como saneadores ambientais, eliminando matérias orgânicas em decomposição (Sick, 1997). Carvalho e colaboradores (2003) afirmam que a condição altamente ácida do estômago de *C. atratus* (Urubu-de-cabeça-preta) contribui para a degradação dos alimentos e constitui uma barreira que neutraliza patógenos microbianos, eliminando possíveis infecções. Porém, por se alimentarem de carniça, essas espécies podem ser afetadas por substâncias absorvidas durante a vida do animal morto (bioacumulação e/ou biomagnificação). Dentre essas substâncias destacam-se produtos de uso veterinário, o chumbo oriundo de armas de fogo, ou substâncias utilizadas na agropecuária para intoxicação proposital. Um declínio significativo de abutres do Novo Mundo do gênero *Gyps* foi registrado recentemente pela ingestão de carcaças de animais tratados com diclofenaco (Soares et al., 2008), comprovando a influência das ações antrópicas no declínio dessas espécies.

Devido às similaridades na dieta, muitas dessas adaptações morfológicas são compartilhadas entre os catartídeos e os abutres do Velho Mundo (Gypaetinae e Aegypiinae; Accipitridae), historicamente gerando muita confusão na taxonomia dos grupos em questão (Brito, 2008).

Os caracteres morfológicos considerados exclusivos dos Cathartidae, que os diferenciam dos abutres no Velho Mundo, são a falta de separação interna das narinas e a falta de um hálux funcional devido à posição mais cranial de sua articulação com o tarsometatarso (Houston, 1994).

Além das adaptações morfológicas para alimentação, os Cathartidae apresentam outras características peculiares, como a ausência de siringe, órgão responsável pela vocalização das

aves (Sick, 1997). Entretanto, essas espécies são capazes de bufar fortemente, este som é provavelmente produzido pela passagem do ar nos sacos aéreos (Houston, 1994).

Os abutres do Novo Mundo possuem diversos mecanismos comportamentais e fisiológicos para a regulação da temperatura corporal, sendo eles, abertura das asas, distensão ou retração do pescoço e da cabeça, e excreção de urina e fezes sobre as pernas, comportamento denominado urohidrosis (Arad; Bernstein, 1988; Arad et al., 1989; Sick, 1997). De acordo com o trabalho realizado por Arad et al. (1989), a pele nua da cabeça de *C. aura* é caracterizada pela presença de grandes veias superficiais que auxiliam na termorregulação corporal. Em altas temperaturas ocorre a vasodilatação, gerando perda de calor, quando em temperaturas baixas, a vasoconstrição auxilia na conservação do calor.

2.2 *Coragyps atratus* (Bechstein, 1793)

A espécie *Coragyps atratus* é a mais abundante e comum da família. Sua plumagem é totalmente negra, exceto pelas bases das penas primárias invadidas de branco, com partes nuas cinza-escuras. Distribui-se desde o sul/sudeste dos Estados Unidos até o paralelo 41°S na fronteira entre o Chile e a Argentina. São aves de hábitos gregários que possuem comportamento agressivo durante a disputa de alimentação. Estes urubus são mais comumente encontrados em áreas não florestadas, frequentemente associados a áreas urbanas, onde se beneficiam de dejetos, lixões e aterros sanitários (Houston, 1994; Sick, 1997; Ferguson-Lees; Christie, 2001).

São considerados necrófagos obrigatórios, fornecem serviços ecossistêmicos inestimáveis, aumentando o fluxo de nutrientes nas cadeias alimentares e reduzindo a transmissão de doenças infecciosas através da remoção de carniça. Especializados no consumo de carcaças, os abutres estão adaptados para detectar e remover carcaças de paisagens com mais eficiência do que qualquer outro necrófago vertebrado terrestre (Byrne et al., 2019).

O urubu-preto possui um comprimento total que varia entre 60 e 70cm, com uma envergadura entre 1,3 e 1,6m. Em relação ao peso há uma pequena diferença entre as três subespécies reconhecidas: *Coragyps atratus atratus* (Bechstein, 1793), *Coragyps atratus foetens* (Lichenstein, 1817) e *Coragyps atratus brasiliensis* (Bonaparte, 1850). Sendo que indivíduos que habitam as planícies tropicais da América do Sul possuem entre 1,180kg e 1,940kg, enquanto indivíduos que ocorrem na América do Norte e nos Andes seu peso varia de 1,600kg a 2,750kg (Houston, 1994; Campbell, 2015).

O *C. atratus foetens* e *C. atratus atratus* possuem o mesmo porte, porém o primeiro possui uma plumagem um pouco mais escura, suas marcas brancas nas asas são menores e a cobertura inferior das asas é mais escura. A subespécie *C. atratus brasiliensis* possui um tamanho menor em relação às outras duas e a cobertura inferior das asas é mais clara (Campbell, 2015).

A espécie é monomórfica, ou seja, não apresentam dimorfismo sexual. O local de nidificação é bastante variável, podendo ser encontrados em cavernas rasas, entre rochas, ocos de árvores, troncos caídos e edifícios urbanos, sem nenhum material de substrato (Rabenold, 1986; Houston, 1994; Márquez et al., 2005).

A fêmea põe dois ou três ovos no chão. Ambos os pais incubam e alimentam os filhotes, regurgitando comida no local do ninho. A maioria das aves constrói estruturas de ninhos buscando uma função termorreguladora para os ovos e posteriormente para os filhotes, que são fundamentais para o sucesso da reprodução das aves (De Vault et al., 2019). O período de incubação é de 30 a 45 dias, podendo se estender até 55 dias (Rabenold, 1986; Houston, 1994; Márquez et al., 2005).

C. atratus é extremamente adaptada às atividades humanas. Essa adaptação se dá principalmente devido à oferta de alimentos que são gerados pelos humanos devido à incorreta destinação final de resíduos. Por conta do amplo crescimento urbano, a presença dessas aves é cada vez maior nas cidades, sendo menos observada em áreas florestadas. Tal situação de desequilíbrio ecológico pode acarretar diversos problemas devido ações antrópicas como por exemplo, o risco de colisão entre aeronaves, alterações do habitat, acidentes e aparecimento de doenças (Neto et al., 2006; Petersen et al., 2011; De Garine-Wichatitsky et al. 2013).

2.3 Coleta e Processamento das Amostras Sanguíneas

Na medicina de animais selvagens, os exames laboratoriais são indicados como apoio para diagnóstico, monitoramento e prevenção de doenças. Contudo, podem ser empregados também, como biomarcadores de impacto ambiental, uma vez que, o meio ambiente influencia a vida dos seres que com este interagem (Almosny, 2014).

O exame laboratorial inicia-se na contenção e coleta, que por sua vez, deve ser realizada de maneira adequada e cuidadosa, respeitando as particularidades de cada espécie (Almosny; Monteiro, 2007). O volume adequado de sangue varia de acordo com o tamanho e estado de saúde da ave, sendo recomendada a coleta de até 1% do peso vivo do animal, desde que estes estejam hígidos (Campbell, 2014).

Nas aves, as principais veias utilizadas para a punção são a jugular (preferencialmente a direita, pois ela pode ser a única presente ou a de maior calibre), basílica (ulnar cutânea, da asa ou braquial) e a metatársica medial (tibial caudal) (Campbell, 2014).

Amostras sanguíneas podem ser colhidas em seringas, tubos capilares ou microtubos, e as agulhas devem apresentar o calibre entre 23 a 27 mm, conforme o porte da ave. A sucção deve ser leve, pois, as veias podem colabar-se facilmente. Em aves de pequeno porte, poucas gotas de sangue podem ser colhidas, sendo necessário a utilização do tubo capilar (Santos; Cubas, 2014).

O anticoagulante indicado é o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), pois possibilita a coloração adequada das células e não tende a agrupar leucócitos. Certos grupos aviários, como corvos, gralhas e alguns passeriformes, necessitam da utilização da heparina, pois o EDTA pode ocasionar anticoagulação incompleta ou hemólise parcial (Campbell, 2014).

As aves assim como os répteis, anfíbios e peixes possuem eritrócitos nucleados de formato ovalado. Os eritrócitos maduros das aves em geral são maiores do que os de mamíferos, mas menores do que os de répteis (Almosny; Monteiro, 2007).

O hemograma não deve ser realizado em contadores automáticos, tendo em vista a dificuldade dos equipamentos em diferenciarem eritrócitos, trombócitos e leucócitos, pela presença de núcleo nos três tipos celulares. Dessa forma, o processamento das amostras é predominantemente manual (Almosny; Monteiro, 2007).

As provas laboratoriais que compõem o hemograma nas aves são: contagem total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos em câmara de Neubauer com diluente Natt & Herrick. A diluição para realização da hematimetria é 1:100 e a contagem é efetuada em aumento de 400x, uma vez que é necessário diferenciar as células durante o processo. Utiliza-se o retículo de eritrócitos (na câmara) para contagem de todas as células, cujos leucócitos e trombócitos são contados nos 25 quadrados, obtendo um valor que será multiplicado pelo fator 1.000. Os eritrócitos são mensurados apenas em cinco quadrados do retículo, utilizando o fator de multiplicação de 5.000. Os leucócitos também podem ser contados nos quadrantes laterais (retículos de leucócitos), como nos mamíferos, porém o fator de multiplicação nesse caso será de 250 (Almosny; Monteiro, 2007; Schmidt, 2014).

A confecção do esfregaço sanguíneo também é uma etapa importante na realização do hemograma e, recomenda-se que seja realizado antes que o material sanguíneo entre em contato com o anticoagulante, ou seja, sem o EDTA. Essa técnica permite a realização da contagem diferencial de leucócitos por microscopia de luz, observação morfológica das células e a pesquisa de hemoparasitos com menor interferência (Almosny; Monteiro, 2007).

O hematócrito é determinado pelo método de centrifugação do capilar sanguíneo, velocidade de rotação de 10.000 a 12.000 rpm durante 5 minutos (Clark et al., 2009). A concentração de hemoglobina é avaliada utilizando-se kits comerciais (Almosny; Monteiro, 2007) e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) são calculados considerando os valores do hematócrito, hemoglobina e contagem de hemácias (Almosny; Monteiro, 2007).

2.4 Interpretação das Análises Laboratoriais

O hemograma é o principal exame laboratorial de triagem e, portanto, o primeiro a ser solicitado. Sua análise auxilia na informação do estado geral do animal, para elucidar uma suspeita clínica e direcionar o médico veterinário à solicitação de outros exames complementares. A avaliação hematológica é composta pelo eritrograma, leucograma e trombograma e visa detectar e dimensionar condições como anemia, doenças inflamatórias, parasitemias, disfunções hemostáticas e distúrbios hematopoiéticos (Campbell; Almosny, 2014).

A determinação do hematócrito, concentração de hemoglobina e a contagem de eritrócitos auxiliam no diagnóstico da anemia e a avaliação da sua intensidade (Tvedten, 2009; Thrall, 2012).

As anemias em aves têm causas semelhantes às demais espécies. As anemias podem ser etiológicamente classificadas como hemolítica, hemorrágica, hipoplásica e aplásica por depressão da medula óssea. As anemias hemorrágicas geralmente estão relacionadas a lesões traumáticas ou a parasitos hematófagos, no entanto, outras causas, como coagulopatias ou lesões ulcerativas, também devem ser consideradas. Anemia hemolítica, pode ser decorrente de reações imunomediadas ou parasitemias, sepses ou intoxicações. Os parasitos mais comumente associados à anemia hemolítica em aves pertencem ao gênero *Plasmodium* spp. A anemia por depressão da medula óssea pode estar relacionada a doenças inflamatórias crônicas, especialmente aquelas envolvendo agentes infecciosos (tuberculose, aspergilose e clamidiose), ou doenças hepáticas, renais crônicas e o hipotireoidismo (Campbell, 2014).

Os tipos de leucócitos presentes no sangue periférico das aves são heterófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos. As aves apresentam ligeira variação morfológica entre os tipos de leucócitos, além de diferenças nos valores numéricos dessas células, intra e interespecies (Schmidt, 2014).

A contagem total de leucócitos pode apresentar-se normal, aumentada (leucocitose) ou reduzida (leucopenia). As leucocitoses podem estar associadas a redistribuição intravascular, devido ao estresse e isso pode interferir na análise do leucograma, ou por causas inflamatórias, podendo ser infecciosas ou não. A leucopenia, pode ocorrer em doenças inflamatórias superagudas, devido à rápida mobilização de heterófilos para os órgãos alvo (Campbell, 2014).

Os heterófilos são as células mais comuns no sangue das aves. Sua função é similar aos neutrófilos dos mamíferos, participam ativamente em reações inflamatórias, atuando como fagócitos. Apresentam grânulos eosinofílicos alongados que podem ser ovais ou arredondados no interior do citoplasma e núcleo lobulado com aspecto grosseiro (Almosny; Monteiro, 2007; Campbell, 2014).

Os eosinófilos apresentam o mesmo tamanho dos heterófilos, também possuem grânulos eosinofílicos, porém esses grânulos são arredondados e coram-se de maneira mais intensa, quando comparados aos heterófilos. Em aves, costumam estar relacionados a processos alérgicos e parasitários (Almosny; Monteiro, 2007; Campbell, 2014).

Os basófilos tendem a ser menores que os heterófilos e os eosinófilos, possuem grânulos metacromáticos que em geral obscurecem o núcleo. Assemelham-se morfológicamente aos mastócitos de mamíferos. Sua função é pouco conhecida, porém, acredita-se estar associado a reações inflamatórias agudas e reações de hipersensibilidade do tipo IV. Apresentam histamina nos grânulos citoplasmáticos, assim como os mastócitos (Campbell, 2014).

Os linfócitos das aves são semelhantes aos dos mamíferos, possuindo núcleo arredondado e pouco citoplasma, porém, tendem a apresentar irregularidades citoplasmáticas ao moldarem-se ao redor de células adjacentes. Podem ser classificados de acordo com o tamanho (pequenos, médios e grandes). Linfócitos grandes podem ser vistos no sangue de aves normais, contudo, podem ser confundidos com monócitos, pelo seu tamanho e volume citoplasmático (Campbell, 2014). As linfocitoses estão associadas a afecções virais ou nas fases de resolução de infecções bacterianas. As linfopenias podem estar associadas a fase aguda da inflamação, assim como, ao uso de corticosteroides, que determinam grave linfopenia, sendo observado também em casos de estresse prolongado, que eleva os níveis endógenos (Almosny; Monteiro, 2007).

Monócitos, as maiores células sanguíneas na circulação das aves, são morfológicamente semelhantes à dos mamíferos e podem apresentar formato arredondado a ameboides e citoplasma abundante, azul-acinzentado podendo apresentar vacúolos e grânulos. Exibem atividade fagocítica e migram para os tecidos para se diferenciarem em macrófagos. Estão envolvidos na inflamação e na destruição oxidativa de microrganismos invasores e desempenham também importante papel imunológico no processamento de apresentação de antígenos. A monocitose normalmente está relacionada a afecções crônicas, doenças infecciosas específicas e necroses, principalmente quando extensas, além de ser observada também em casos de neoplasias (Dieterien-lievre, 1988; Almosny; Monteiro, 2007; Campbell, 2014).

2.5 Parasitismo em Aves

Estudos envolvendo a ecologia dos parasitos, sua diversidade e influência sobre seus hospedeiros vêm sendo bastante abordado em pesquisas científicas nas últimas décadas (Secchi et al., 2003), uma vez que são capazes de exercer importantes pressões evolutivas e ecológicas em seus hospedeiros, sendo considerados, segundo alguns autores, como agentes de seleção natural das espécies (Hakkarainen et al., 1998; Marzal et al., 2005).

Do ponto de vista epidemiológico, as aves são consideradas importantes hospedeiros definitivos ou intermediários, visto que podem ser infectadas por diversos agentes patogênicos devido suas características de migração e nidificação, favorecendo contato com inúmeros vetores artrópodes e espécies animais (Bjöersdorff et al., 2001; De La Fuente et al., 2015). No que diz respeito as aves carnívoras, seu hábito alimentar (ingestão de vísceras e o contato íntimo com presa ou carcaças), pode favorecer infestações por ectoparasitos vetores e infecções por endoparasitos (Pitarelli; Pereira, 2002).

A relação entre o parasito e seu hospedeiro não necessariamente se traduz em uma doença, um dos princípios bem defendidos entre os parasitologistas é que o parasito não mata o seu hospedeiro, pois ao fazê-lo, causaria sua própria morte (Bennett; Bishop, 1990). No entanto, fatores intrínsecos (como perda de peso, imunossupressão etc.) e extrínsecos (estresse,

por exemplo) podem exacerbar alguns efeitos do parasitismo, resultando em sinais clínicos importantes (Samour, 2006).

Apesar de comum em animais de vida livre, os parasitos podem oferecer grande risco à saúde do seu hospedeiro (Freitas et al., 2002), principalmente quando associado a condições de alta densidade populacional, interação entre diferentes espécies e, exposição dos parasitos a hospedeiros que não possuem sistema imunológico competente para combater a infecção (Greiner; Ritchie, 1994; Freitas et al., 2002; Chagas, 2016). Desse modo, o parasitismo pode influenciar de diversas formas, seja em sua fisiologia, comportamento, processos de competição, migração, especiação e estabilidade de ecossistemas (Amato; Amato, 2010).

As aves são hospedeiras de vários parasitos, entre eles, destacam-se os parasitos sanguíneos (hemoparasitos), pertencentes a ordem Haemosporida (gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*), Família Hepatozoidae (gênero *Hepatozoon*), piroplasmídeos (gênero *Babesia*), Família Trypanosomatidae (gênero *Trypanosoma*), Filarídeos e outros (Garnham, 1966; Feldman et al., 1995; Hannover, 2000). Estes parasitos podem exercer importantes pressões ecológicas e evolutivas nas características da história de vida das aves infectadas (Merino et al., 2000; Hõrak et al., 2001; Marzal et al., 2005), seja através de efeitos na sobrevivência dos seus hospedeiros (Sorci; Møller, 1997; Møller; Nielsen, 2007), no sucesso reprodutivo (Merino et al., 2000; Knowles et al., 2010), ou na coloração da plumagem (Hõrak et al., 2001; Del Cerro et al., 2010), desencadeando importância ecológica e consequências evolutivas, modificando estruturas de comunidades dos indivíduos acometidos (Van Riper et al., 1986).

A taxa de infecção varia muito entre as diferentes ordens de aves (Bennett et al., 1993b; Valkiūnas, 2005), mas as razões para a ampla variação taxonômica na prevalência ou diversidade de parasitos ainda são pouco compreendidas (Scheuerlein; Ricklefs, 2004; Arriero; Møller, 2008; Moens; Pérez-Tris, 2016). Embora alguns táxons de aves sejam fortemente afetados, outros são pouco atingidos (Martinez-Abraín, 2004; Valkiūnas et al., 2003), especialmente em grupos como aves marinhas (Peirce; Brooke, 1993; Merino et al., 1997; Merino; Minguéz, 1998; Engström et al., 2000; Quillfeldt et al., 2010).

Além do aparente viés filogenético na incidência de infecções parasitárias entre os táxons de aves, há também algumas evidências de que os parasitos sanguíneos são menos comuns em certos habitats, como a tundra ártica (Bennett et al., 1992a), ambientes áridos (Little; Earle, 1995; Valera et al., 2003), ambientes insulares (Little; Earle, 1994) ou ambientes marinhos (Piersma, 1997; Figuerola, 1999). Várias hipóteses foram propostas para explicar essa ausência (Martinez-Abraín et al., 2004), como a ausência e até mesmo escassez de vetores adequados, devido uma associação altamente específica entre hospedeiro e parasitos, sendo a troca de hospedeiro pouco frequente, ou em virtude da capacidade imunológica do hospedeiro que previnem a infecção (Quillfeldt et al., 2014).

2.6 Gênero *Hepatozoon*

Hepatozoon sp. (Filo Apicomplexa pertencente ao subgênero Adelorina, Família Hepatozoidae) são hemoparasitos chamados hemogregarinas (Coccidia: Adeleorina), sendo protistas intracelulares que ocorrem em todas as classes de vertebrados (Davies; Johnston 2000). O gênero *Hepatozoon* é uma coleção de parasitos sanguíneos apicomplexos que foram descritos em todos os grupos de vertebrados terrestres e em uma ampla gama de invertebrados hematófagos (Levine, 1988).

Hospedeiros vertebrados parasitados por este gênero incluem as aves (Hoare, 1924), mamíferos (Wenyon, 1926), crocodilianos (Hoare, 1932), lagartos (Robin, 1936), cobras (Ball

et al., 1967), tartarugas (Michel, 1973) e anuros (Desser et al., 1995). Também foi demonstrado que grande variedade de invertebrados serve como vetores e hospedeiros definitivos, incluindo carrapatos, ácaros, percevejos, flebotomíneos, mosquitos culicídeos e anofelinos, moscas tsé-tsé (Telford, 1984), piolhos (Clark et al., 1973), pulgas (Göbel; Krampitz, 1982; Bennett et al., 1992a) e sanguessugas (Pessôa; Cavalheiro, 1969a; Pessôa; Cavalheiro, 1969b).

Hepatozoon é um dos seis gêneros de parasitas sanguíneos classificados como hemogregarinas, todos com um ciclo de vida heteroxeno envolvendo um hospedeiro vertebrado intermediário e um hospedeiro invertebrado definitivo que se alimenta de sangue. Outros gêneros incluem *Desseria* e *Cyrilia*, que infectam peixes e sanguessugas, *Karyolysus*, que são hemogregarinas de lagartos e ácaros, *Hemolivia*, que contém uma espécie que infecta sapos e carrapatos, e *Haemogregarina* (Smith, 1996). Historicamente, parasitos sanguíneos de anfíbios, cobras, lagartos, crocodilianos, aves e mamíferos também foram incluídos no gênero *Haemogregarina* como resultado da semelhança morfológica de gamontes entre hemogregarinas de diferentes gêneros (Mohammed; Mansour, 1959; Ball, 1967; Wozniak; Telford, 1991).

Com essas evidências e dados filogenéticos, Siddall (1995) revisou extensivamente o complexo hemogregarina, transferindo 41 espécies de *Haemogregarina* para um gênero *Desseria*, redefinindo o gênero *Cyrilia*, e sugerindo que todas as hemogregarinas que infectam cobras, lagartos, crocodilianos, aves e mamíferos que permaneceram no gênero *Haemogregarina* fossem transferidos para *Hepatozoon*.

2.6.1 Ciclo de vida

As espécies de *Hepatozoon* exibem uma ampla variedade de ciclos de vida, o que é compatível com a variedade de hospedeiros vertebrados e invertebrados utilizados por esses parasitos. No entanto, um aspecto básico do ciclo de vida é que o desenvolvimento esporogônico e a formação de oocistos ocorrem em um invertebrado hematófago, enquanto o desenvolvimento merogônico ocorre em diferentes tecidos (fígado, baço, medula óssea, gânglios linfáticos, intestino) e gamontogônico em eritrócitos e/ou, mais frequentemente leucócitos em aves e mamíferos de vertebrados. A complexidade dos ciclos de vida manifesta-se na formação de cistos dizóicos latentes nos órgãos internos, especialmente no fígado e nos pulmões, de alguns hospedeiros vertebrados infectados com espécies de *Hepatozoon* (Smith, 1996).

Sua transmissão ocorre através da ingestão direta de invertebrados hematófagos, como insetos dípteros, carrapatos, ácaros e outros invertebrados (Smith, 1996; Davies; Johnston, 2000), ou indiretamente através da ingestão/predação de um hospedeiro paratênico com cistos teciduais (Davies; Johnston, 2000). O desenvolvimento da maioria das espécies de *Hepatozoon* ocorre no hemocele do hospedeiro invertebrado (Desser, 1993) após o repasto sanguíneo, onde ocorre o desenvolvimento esporogônico e, finalmente, a formação de grandes oocistos, também conhecidos como grandes oocistos multiesporocísticos, que contêm esporocistos com esporozoítos, os estágios infecciosos do parasito que, ao serem ingeridos pelo hospedeiro vertebrado intermediário, dão origem a estágios merogônicos no fígado (Desser et al. 1995; Netherlands et al., 2017).

Ball et al. (1967), Ball et al. (1969), Bashar et al. (1991) e Smith et al. (1994) demonstraram que a fase esporogônica do parasito inicia-se com a ingestão de microgamontes e macrogamontes de *Hepatozoon* sp. durante repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado infectado. Em seguida, os gamontes migram para a parede intestinal onde ocorre a gametogênese. Um microgamonte dá origem a quatro microgametas uniflagelados que, por

singamia, fecundam os macrogametas, originados de macrogamontes, formando um zigoto. O zigoto cresce rapidamente e atravessa a parede intestinal, localizando-se na hemocele do vetor hematófago. Nesse local, forma um oocisto com múltiplos esporocistos com esporozoítos (estágio evolutivo infectante para o hospedeiro vertebrado). Quando o artrópode é ingerido, os esporozoítos são liberados e inicia-se a fase do ciclo no hospedeiro vertebrado. Os esporozoítos podem seguir para os hepatócitos, formando um cistozoíto, ou iniciar o primeiro ciclo merogônico. Dois tipos de merontes são formados: um contendo macromerozoítos que, transportados via sangue ou linfa, invadem novos tecidos e outro, contendo micromerozoítos, que irão penetrar nos eritrócitos, sofrer gamontogonia e dão origem aos gamontes circulantes, infectantes para os vetores hematófagos (Smith, 1996).

Gamontes de determinadas espécies de *Hepatozoon* estão restritos ao tipo de célula sanguínea que infectam. Os gamontes de algumas espécies são encontrados nos eritrócitos (Hoogstraal, 1961; Furman, 1966), enquanto os de outras espécies infectam leucócitos (Clark, 1958; Krampitz, 1964; Harmelin et al., 1992) como nos mamíferos e aves. Em infecções baixas ou moderadas (valores de parasitemia inferiores a 5%), a maioria dos eritrócitos parasitados contém apenas um gamonte. No entanto, em infecções mais graves, como aquelas frequentemente observadas em cobras, dois ou mais gamontes podem infectar o mesmo eritrócito, e em infecções onde mais de 90% dos eritrócitos estão parasitados, foram relatados três ou quatro gamontes dentro de um único eritrócito (Plimmer, 1912; Smith et al., 1994). Tais infecções também são caracterizadas por gamontes invadindo linfócitos e neutrófilos, células normalmente não parasitadas por gamontes hemogregarinos de cobras. Os gamontes exibem motilidade no sangue, movendo-se livremente de eritrócito para eritrócito e são frequentemente detectados como "viajantes" no plasma, um comportamento que intrigou os primeiros investigadores (Sambon; Seligmann, 1908; Plimmer, 1912).

2.6.2 *Hepatozoon* sp. no hospedeiro aviário

As espécies de *Hepatozoon* em aves são relativamente poucas em número e, parecem ser parasitos incomuns deste grupo de vertebrados. Hoare (1924) transferiu seis espécies de hemogregarinas que infectavam aves para o gênero *Hepatozoon*, sem ter observado um ciclo de vida completo ou ter determinado um hospedeiro definitivo. No entanto, a sua designação genérica provou ser correta, pois Bennett et al. (1992b) encontraram oocistos em carrapatos argasídeos e pulgas que se alimentaram de andorinhas infectadas da África. Bennett et al. (1992b) e Bennett e Peirce (1989) revisaram a taxonomia das espécies de *Hepatozoon* que infectam aves, descrevendo oito novas espécies e redescrevendo e sinonimizando as 12 restantes.

As espécies do gênero *Hepatozoon* diferem de outros parasitos sanguíneos apicomplexos porque aparentemente ocorrem apenas em leucócitos (geralmente monócitos) de aves e mamíferos (Bennett et al., 1992b). No entanto, Merino et al. (2014) relataram a presença da primeira espécie de *Hepatozoon* infectando eritrócitos e não leucócitos dos hospedeiros aviários.

Os microgametócitos e macrogametócitos não podem ser separados com base nas características de coloração ou no tamanho nuclear, e muitos têm um vacúolo redondo a ovóide adjacente ao núcleo. O núcleo tem formato variável (semelhante a uma fita ou disco) e fica intimamente oprimido no lado interno da parede do parasito (Bennett et al., 1992b).

A maioria das infecções são extremamente leves e facilmente ignoradas (Bennett et al., 1992b). O gênero foi classificado por Levine (1988) na família Haemogregarinidae. As hemogregarinas são comumente encontradas em várias aves, répteis, anfíbios e peixes (Kudo,

1977). O grau de especificidade do hospedeiro é desconhecido, devendo, portanto, ser assumido, até que prove o contrário, que tal como acontece com as espécies de *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*, as espécies de *Hepatozoon* são específicas do hospedeiro a nível familiar ou subfamiliar (Bennett et al., 1992b).

O ciclo de vida completo é desconhecido para qualquer uma das 20 espécies aviárias válidas (Quadro 1). Embora vários ciclos de vida sejam conhecidos tanto para as formas mamíferas como reptilianas (Bennett et al., 1992b). Geralmente, a esquizogonia ocorre nas células do fígado, baço e outros órgãos dos vertebrados, os merozoítos entram nos eritrócitos ou leucócitos e se desenvolvem em gametócitos (Kudo, 1977). Os vetores são carrapatos ou pulgas (Bennett et al., 1994) nos quais microgametas e macrogametas se desenvolvem e se unem para formar zigotos que se tornam oocistos produzindo esporozoítos (Kudo, 1977).

Quadro 1. Espécies de *Hepatozoon* aviário

Família das aves	Espécies do parasito	Referências
Accipitridae	<i>Hepatozoon neophrontis</i>	Bennett et al., 1992b
Sagitariidae	<i>Hepatozoon ellisgreineri</i>	Valkiūnas et al., 2016
Apterygidae	<i>Hepatozoon kiwii</i>	Peirce et al., 2003
Diomedidae	<i>Hepatozoon albatrossi</i>	Peirce; Prince, 1980
Emberizidae	<i>Hepatozoon paroariae</i>	Bennett et al., 1992b
Thraupidae	<i>Hepatozoon rhamphocoeli</i>	Bennett et al., 1992b
Estrildidae	<i>Hepatozoon estrildus</i>	Bennett et al., 1992b
Hirundinidae	<i>Hepatozoon atticorae</i>	Bennett; Peirce, 1989
Laniidae	<i>Hepatozoon lanis</i>	Bennett et al., 1992b
Ianiidae	<i>Hepatozoon malacotinus</i>	Bennett et al., 1992b
Sylviidae	<i>Hepatozoon sylvae</i>	Bennett et al., 1992b
Paridae	<i>Hepatozoon parus</i>	Bennett; Peirce, 1989
Passeridae	<i>Hepatozoon passeris</i>	Bennett et al., 1995
Numididae	<i>Hepatozoon numidis</i>	Bennett et al., 1992b
Pittidae	<i>Hepatozoon pittae</i>	Bennett et al., 1992b
Prionopidae	<i>Hepatozoon prionopis</i>	Bennett; Earlé, 1992
Acrocephalidae	<i>Hepatozoon kabeeni</i>	Kruszewicz; Dyrz, 2000; Biedrzycka et al., 2013; Chagas et al., 2021
Apodidae	<i>Hepatozoon apodis</i>	Barracough et al., 2008
Zosteropidae	<i>Hepatozoon zosteropis</i>	Bennett et al., 1992b
Hydrobatidae	<i>Hepatozoon peircei</i>	Merino et al., 2014

2.6.3 Diagnóstico

A pesquisa por hemoparasitos pode ser realizada principalmente por meio de duas técnicas diretas, a de esfregaço sanguíneo (análise microscópica) ou por técnicas moleculares. A técnica de esfregaço sanguíneo, apesar de sua baixa sensibilidade, permite estimar a intensidade da infecção e a prevalência de hemoparasitos, além de possibilitar a observação morfológica dos estágios sanguíneos (trofozoítas, gametócitos, etc.) do parasito. Essa técnica também permite a quantificação dos hemoparasitos por meio de contagem em eritrócitos parasitados em relação aos não parasitados (Van Ripper et al., 1986).

Os gametócitos hemogregarinos são alongados, com extremidades arredondadas e geralmente ficam isolados dentro dos eritrócitos, mas às vezes são observados livres, no espaço extracelular, o que é consistente com os achados descritos por Telford et al. (2004) e Sloboda et al. (2007). Entretanto, a morfologia dos gametócitos dos *Hepatozoon*, infelizmente, não fornece uma pista confiável para a diferenciação genérica. Assim, são necessários outros dados relevantes como as características da esporogonia e hospedeiro acometido (Siddall; Desser, 1991). No estágio de esquizogonia (merogonia), as hemogregarinas são caracterizadas por sua considerável capacidade de invadir e se desenvolver dentro de diferentes órgãos e tipos de células dentro do hospedeiro vertebrado. Bray (1964) propôs que hemogregarinas com esquizontes no fígado deveriam ser alocadas no gênero *Hepatozoon*. Em contrapartida, aquelas espécies que precedem a esquizogonia em outros órgãos deveriam pertencer a outro gênero como *Haemogregarina* ou *Karyolysus*.

A maioria dos gametócitos hemogregarinos não invadem o núcleo da célula hospedeira, mas em vez disso movem-se para o lado oposto ou para o outro polo da célula hospedeira. Isto é contrário ao efeito do gênero *Karyolysus*, onde apresenta um impacto cariолítico no núcleo da célula hospedeira e, portanto, é identificado como *Karyolysus Reichenow* (Reichenow, 1913).

Até o momento, a taxonomia atual das hemogregarinas enfrenta grande desafio devido à alta variação na morfologia dos gamontes, à baixa especificidade do hospedeiro, em muitos casos os hospedeiros invertebrados são desconhecidos e, poucos detalhes da esquizogonia. Portanto, abordagens moleculares são ferramentas indispensáveis para distinguir populações de parasitos morfológicamente idênticos, mas geneticamente diferentes, incluindo abordagens moleculares, reação em cadeia da polimerase (PCR) (Rubini et al., 2006; Ortuño et al., 2008; Vilcins, et al., 2009; Harris et al., 2011; Maia et al., 2012; Tomé et al., 2013; Xavier et al., 2018; Chagas et al., 2021).

Quanto às técnicas moleculares para detecção de parasitos, a PCR é uma técnica que utiliza a variação das sequências genéticas para detectar diferentes linhagens destes agentes. Segundo Henning et al. (1999), para estudos epidemiológicos, que em sua maioria possuem volume de amostras limitados, a utilização da técnica de PCR é bastante conveniente, uma vez que amplifica uma sequência genômica específica.

Ensaio baseado em PCR como teste diagnóstico de referência garantem maior sensibilidade, principalmente para testar diferentes hospedeiros com níveis intermitentes de parasitemia, via baixa taxa de infecção por gamontes (Otranto et al., 2011; Haklová-Kočíková et al., 2014; Jözsef et al., 2015; Ramos et al., 2015; Mitkova et al., 2017). Notavelmente, todas as evidências moleculares vêm das sequências completas e parciais da subunidade pequena (SSU) do DNA ribossômico (rDNA). O gene 18S é um marcador filogenético suficiente para aproximar as relações de nível ordinal e aquelas dentro das ordens (Waeschenbach et al., 2007; Arizza et al., 2016; Bhusri et al., 2017; Ahmad et al., 2018; Hayes; Smit, 2019; Zechmeisterová et al., 2019; Nordmeyer et al., 2020).

Poucos estudos abordaram caracterização molecular e filogenia de espécies de *Hepatozoon* aviário, a maioria dos relatos descreveram a presença de parasitos *Hepatozoon* em aves usando exclusivamente características morfológicas dos estágios sanguíneos (Bennett et al., 1992b; Kruszewicz; Dyrz, 2000; Peirce, 2005; Shurulinkov, 2005; Shurulinkov; Valkiūnas, 2005; Chakarov, 2006; Barraclough et al, 2008).

Merino et al. (2014) apontaram *Hepatozoon peircei*, um parasito que habita os glóbulos vermelhos em petréis *Oceanodroma melania*. Enquanto outros estudos confirmaram a partir de estudos moleculares que, alguns parasitos sanguíneos de aves, anteriormente atribuídos ao gênero *Hepatozoon*, estão intimamente relacionados a parasitos de lagartos e anfíbios e podem pertencer ao gênero *Lankesterella* (Merino et al., 2006; Biedrzycka et al., 2013; Chagas et al., 2021). Portanto, mais pesquisas são necessárias, de preferência combinando análises morfológicas e moleculares, bem como observações experimentais em vetores e hospedeiros

vertebrados, a fim de melhor compreender a biologia das espécies aviárias de *Hepatozoon* e *Lankesterella* e esclarecer o status taxonômico desses hematozoários (Chagas et al., 2021).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Autorização para Pesquisa com Animais Silvestres

O estudo teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo nº010/2021, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estácio de Sá, Campus Vargem Pequena. A coleta do material biológico foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), através do sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio) protocolo nº 47069-4.

3.2 Animais

Vinte Urubus-preto da espécie *Coragyps atratus* foram amostrados para a realização do estudo. As aves estavam mantidas no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) (22°72'35" S; 43°70'98" W), localizado no município de Seropédica-RJ, provenientes de apreensão ou resgate. Estas aves foram atendidas no Hospital Veterinário de Pequenos Animais (HVP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sendo submetidas à avaliação clínica e colheita de sangue para a avaliação hematológica e realização dos ensaios moleculares. Cinco desses indivíduos além de sangue periférico foram submetidos a colheita de medula óssea, devido ao quadro clínico e a solicitação do médico veterinário.

3.3 Exame Clínico das Aves

Os urubus foram capturados com auxílio de puçá e contidos fisicamente com luva de raspa de couro. Durante a avaliação clínica foi aferido temperatura, verificado qualidade das penas, avaliação dos olhos, narinas, ouvidos, orofaringe, bico, averiguado presença de ectoparasitos e presença de fraturas que inviabilizassem reintrodução à natureza.

Os animais foram pesados e o escore corporal analisado segundo Grespan e Raso (2014), utilizando como padrão o sistema de pontuação, seguindo a escala de 1 a 5, tendo como referência o tamanho dos músculos peitorais e a quilha (Figura 1). Todos os dados foram registrados em fichas clínicas individuais.

Ao término do exame clínico, as 20 aves foram submetidas a colheita de sangue, via veia ulnar. Todas as aves foram incluídas no estudo, independente de apresentarem ou não sinais clínicos. Cinco desses animais apresentaram sinais clínicos inespecíficos (prostração e anorexia), sendo submetidos a colheita de medula óssea para avaliação mais minuciosa.

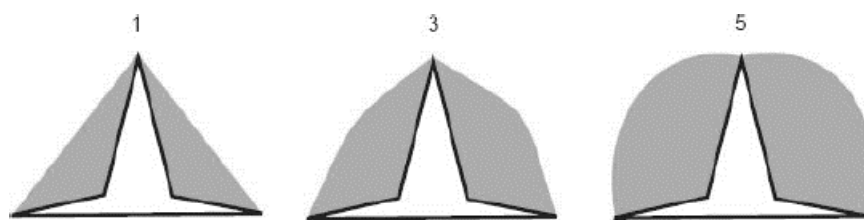


Figura 1. Representação esquemática sobre avaliação da condição corporal através do sistema de pontuação da musculatura peitoral com relação sua projeção a quilha (escore 1 a 5). Fonte: Grespan; Raso (2014).

3.4 Colheita de Sangue

O procedimento de colheita de sangue foi realizado no HVPA, sob contenção física como citado anteriormente. As penas das asas foram umedecidas e afastadas a partir da antisepsia local com álcool 70%. O sangue foi colhido através de venopunção ulnar (Figura 2), visto que o acesso a jugular nestes indivíduos não foi possível devido características anatômicas, uma vez que o pescoço apresenta um espesso colar de penas, a fim de evitar a passagem de líquidos provenientes da dieta às outras partes do corpo (Sick 1997; Fergusson-Lee; Christie, 2001), dificultando o acesso da jugular.

Foram colhidos cerca de 0,5 mL de sangue, utilizando-se seringas de 3 mL e agulhas hipodérmica descartáveis estéreis. O sangue foi acondicionado em microtubos de 0,5 mL contendo o anticoagulante ácido-etilenodiamino-tetra-acético (EDTA), mantidos refrigerado em caixas isotérmicas até o momento do processamento.

Após a colheita, foram confeccionados esfregaços sanguíneos com resquício de sangue presente na seringa, sem a presença de EDTA, a fim de garantir melhor preservação da morfologia das células e evitar interferências do anticoagulante utilizado. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LABVET/UFRRJ), no mesmo dia da obtenção e processadas em um prazo máximo de duas horas após a colheita.



Figura 2. Colheita de sangue em região da asa, veia ulnar em Urubu-preto (*Coragyps atratus*), CETAS – Seropédica – RJ, 2023.

3.5 Colheita da medula

A medula foi colhida sob sedação com quetamina (20mg/kg) e midazolam (1mg/kg) e bloqueio local da pele, tecido subcutâneo e periósteo com lidocaína 1mg/kg (Figura 3) (Carpenter; Harms, 2023), a fim de evitar mínima dor no momento da introdução da agulha e aspiração do material medular.

Posteriormente as penas da região próximo a articulação femorotibiopatelar foram retiradas e o acesso intraósseo foi realizado em região epifisária proximal da tíbia (Figura 3), mediante introdução da agulha tipo Rosenthal rotacionando-a até que esta estivesse firmemente fixada ao osso. Após fixação, uma seringa de 10 ml contendo anticoagulante (EDTA 3%) foi acoplada a agulha e, aspirado cerca de 1mL do conteúdo medular (Figura 3).

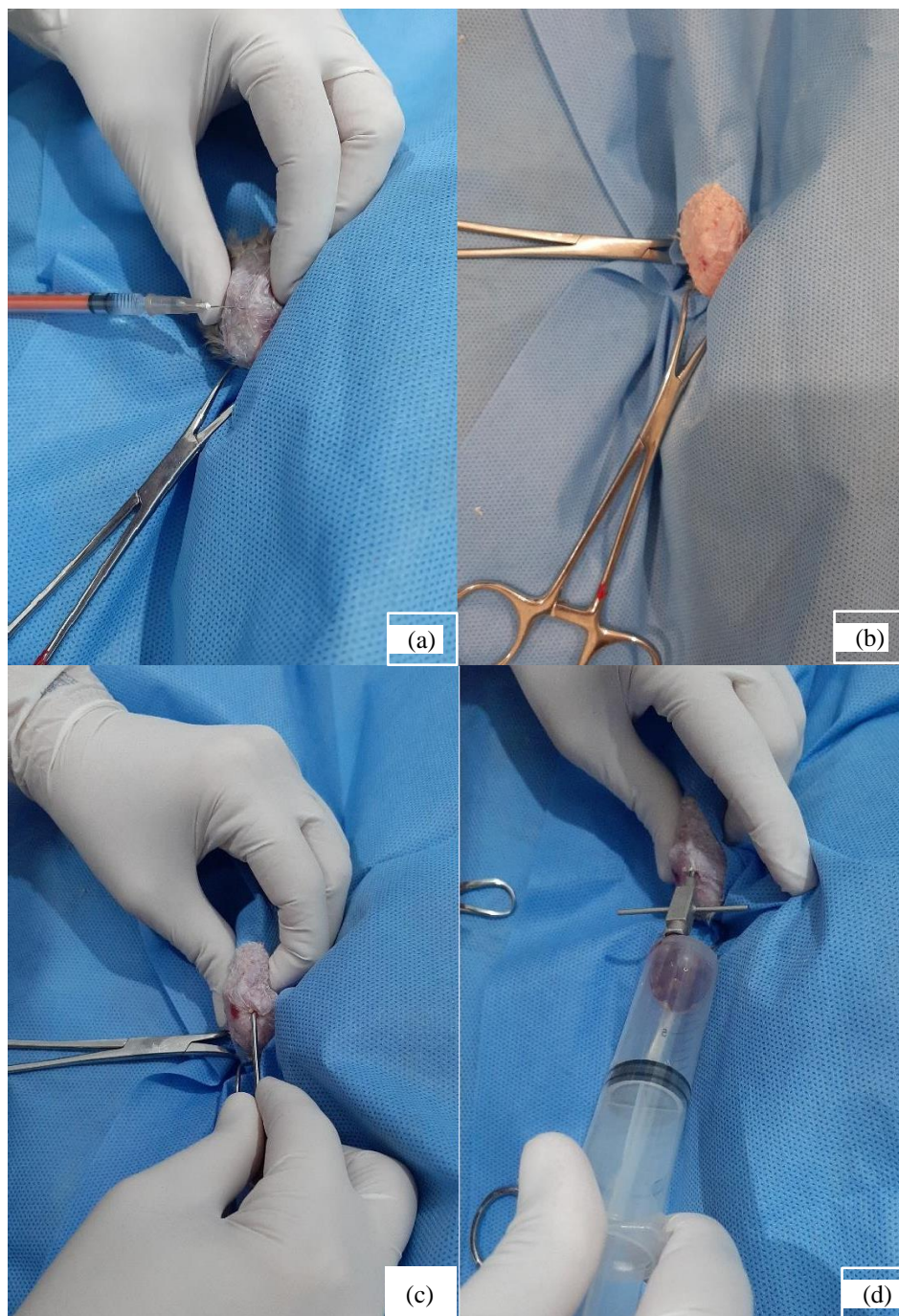


Figura 3. (a) Aplicação bloqueio local com lidocaína. (b) e (c) região proximal a articulação femorotibiopatelar, acesso intraósseo em região epifisária da tíbia. (d) agulha tipo Rosenthal fixada ao osso e aspiração do conteúdo medular. Seropédica, 2023.

Após a colheita, parte do material foi depositado em placa de Petri (Figura 4) e, com auxílio do capilar de microhematócrito foram colhidas as espículas para confecção de pelo menos três esfregaços por método de squash (Figura 5). O esfregaço em squash é o ato de comprimir uma pequena quantidade de tecido entre duas lâminas, deslizando o material obtido, delicadamente. Essa técnica é bastante utilizada para material de sistema nervoso central (como líquido) e também em materiais de pequeno tamanho e difíceis de serem raspados, por exemplo, em biópsias de pâncreas e de mediastino (Moss et al., 1997; Correia et al., 2005). O restante do

aspirado foi acondicionado em tubo contendo EDTA e congelado a -20°C para posterior análise molecular.



Figura 4. Parte do aspirado medular de urubu (*Coragyps atratus*) depositado em placa de Petri para colheita de espículas e confecção do esfregaço. LABVET, Seropédica, 2023.



Figura 5. Confecção esfregaço por método de squash com aspirado de medula óssea de urubu (*Coragyps atratus*) para pesquisa de hemoparasitos em medula óssea. LABVET, Seropédica, 2023.

3.6 Hemograma

O volume globular foi obtido pela técnica de microhematócrito e a hemoglobinometria pelo método de Drabkin utilizando-se kit comercial (Labtest®). A hematimetria, a leucometria global e a contagem de trombócitos foram realizadas manualmente em câmara hematométrica, onde foram efetuadas diluições com o Natt-Herrick na proporção 1:100. A contagem manual foi realizada conforme Almosny e Monteiro (2007), utilizando o aumento de 400x. Os trombócitos foram contados nas 25 subdivisões do quadrante central e os eritrócitos apenas nas cinco subdivisões diagonais do mesmo retículo (Figura 6). Em relação aos leucócitos, sua contagem foi realizada nas 16 subdivisões dos quadrantes laterais. Os valores das contagens destes parâmetros foram calculados com base na diluição, altura da câmara e área contada, resultando em um fator multiplicador: 250 para leucócitos, 1000 para trombócitos e 5000 para eritrócitos.

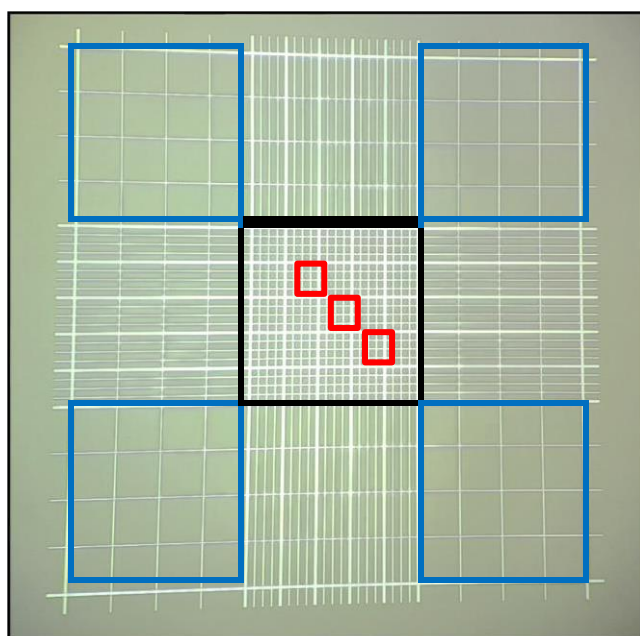


Figura 6. Câmara de Neubauer: retículo de eritrócitos (quadrante central) contagem de trombócitos (toda área destacada em preto), parte destacada em vermelho relacionada a contagem de eritrócitos; Quadrantes laterais, destacado em azul, região de contagem de leucócitos. LABVET, Seropédica, 2023.

A leucometria específica foi realizada por microscopia de luz (microscópio Nikon Eclipse E200 LED), a partir da diferenciação de 100 leucócitos. Para pesquisa de hemoparasitos (*Hepatozoon* sp.) foram avaliados no mínimo 100 campos (Bush et al., 1997). Cada lâmina foi corada por May-Grunwald-Giemsa e examinada em aumento de 1000x.

As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram determinadas com o auxílio de refratômetro manual (Almosny; Monteiro, 2007).

3.7 Extração de DNA

Após o processamento das amostras, o sangue e o aspirado medular restante foram acondicionados em microtubos e mantidos a 20 graus negativos para posterior extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A extração de DNA foi realizada em um fluxo específico (Figura 7), a partir de 10 µL de sangue com kit comercialmente disponível (ReliaPrep Blood gDNA Miniprep System, Promega®), seguindo as recomendações do fabricante. Todas as amostras de DNA total tiveram suas concentrações determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®), separadas em alíquotas e armazenadas à -80°C até a realização dos ensaios moleculares.



Figura 7. Extração de DNA de amostra de sangue total e medula óssea de urubu (*Coragyps atratus*) em fluxo separado. LABVET, Seropédica, 2023.

3.8 PCR Convencional

Após as extrações, todas as amostras foram submetidas a PCR. Anteriormente a detecção dos agentes, todas as amostras foram submetidas a amplificação do gene endógeno Beta actina (ACTB) utilizando primers específicos (Tabela 1), a fim de verificar a presença de DNA do hospedeiro. Posteriormente realizou-se à amplificação do gene alvo 18S rRNA, para detecção de *Hepatozoon*.

3.8.1 Reação gene endógeno Beta actina

A reação da PCR para o gene endógeno foi efetuada utilizando os iniciadores (primers) B-actin-aveF e B-actin-aveR (Wang; Morais, 1992) (Tabela 1), seguindo as seguintes concentrações de reagentes para um volume final de 25 µL: 5,0 µL de DNA, 0,4 mM de dNTP (Invitrogen®), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,25U/µL Xtra Platus Taq DNA Polimerase (Sinapse®), 1X de Tampão da PCR que inclui 2mM de Cloreto de Magnésio e água ultra pura esterilizada (UltraPure™/Invitrogen®).

3.8.2 Reações de amplificação para *Hepatozoon* baseado no gene 18S rRNA

Um total de 25 amostras foram utilizadas para a detecção molecular de *Hepatozoon* sp., sendo 20 amostras extraídas do sangue total dos urubus e 5 amostras de DNA extraídas da medula óssea.

A reação da PCR para o gene 18S rRNA foi efetuada utilizando os iniciadores (primers) EF-M e Hep1615R (Tabela 1), seguindo as seguintes concentrações de reagentes para um volume final de 25 µL: 2,0 µL de DNA, 0,4 mM de dNTP (Invitrogen®), 0,6 µM dos oligonucleotídeos iniciadores, 2,0 mM de MgCl₂ (Platinum/Invitrogen®), 1,5 U de Taq DNA polimerase (Platinum/Invitrogen®), tampão PCR 1x (Platinum/Invitrogen®) e água ultra pura esterilizada (UltraPure™/Invitrogen®). A reação de PCR específica foi realizada em termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems®), utilizando condições de termociclagem previamente estabelecidos (Quillfeldt et al., 2018; Hrazdilova et al., 2021) para obtenção de um produto final de 1600pb (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores e condições de termociclagem para o controle da extração de DNA (gene endógeno) e detecção molecular de *Hepatozoon* sp. baseadas na sequência 18S rRNA.

Agentes e Primers	Sequências dos oligonucleotídeos	Condições de Termociclagem
Beta actina (ave) B-actin-aveF B-actin-aveR	5'-TATCCGTAAGGATCTGTATG-3' 5'-ATCTCGTCTTGTTTTATGCG-3'	5 min à 95°C, 35 ciclos a 95°C por 30s, 54°C por 30s, 72°C por 1min e, 72° por 5min
<i>Hepatozoon</i> sp EF-M Hep1615R	5'AAACTGCAAATGG CTCATT3' 5'AAAGGGCAGGGACGTAATC3'	4 min à 95°C, 32 ciclos a 92°C por 45s, 55°C por 45s, 72°C por 45s e, 72° por 10 min

3.8.3 Controle das reações

Para evitar contaminações dos reagentes e enzimas, foram incluídos controles negativos nas reações de amplificação e extração de DNA. No controle negativo da extração e da reação

de amplificação, as amostras de DNA foram substituídas por uma quantidade equivalente de água ultrapura esterilizada (Invitrogen®). Foram utilizadas ponteiras com filtro em todas as fases da PCR. A extração de DNA e reações de PCR foram realizadas em salas separadas. Todo o preparo das reações e a pipetagem das amostras contendo DNA foram realizados em capela de fluxo laminar distintas, previamente esterilizadas com luz ultravioleta antes de cada reação. Todas as reações de PCR contaram com controles positivos para *Hepatozoon* obtidos pelo LABVET-UFRRJ em amostras sanguíneas de cães provenientes de projetos anteriores.

3.8.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose

A visualização dos produtos da PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose (Figura 8), 1,5% em tampão TAE 1X (tampão Tris-Acetato-EDTA), corados com Brometo de etídio. A eletroforese para o Gene endógeno foi efetuada a 75V por 45 minutos e a eletroforese para reação de *Hepatozoon* sp. foi efetuada a 75V por 60 minutos, utilizando o padrão de tamanho molecular de 100pb DNA Ladder (Invitrogen®) em ambas reações. Os resultados foram visualizados através de transiluminador de luz ultravioleta acoplado ao analisador de imagem (L-pixtouch da Loccus Biotecnologia®).

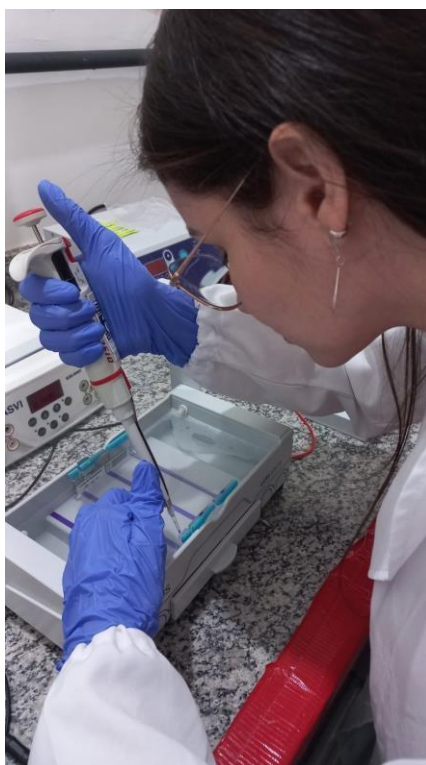


Figura 8. Produtos da PCR adicionados em gel de agarose para realização da eletroforese. Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE), UFRRJ. Seropédica, 2023.

3.9 Análise Estatística

Os dados obtidos no hemograma (eritrograma, leucograma e trombograma) foram agrupados e analisados por estatística descritiva, em termos de média e desvio padrão, erro padrão, valores mínimos e máximos, separadas entre animais positivos e negativos. Foi

realizado o teste ANOVA para dados paramétricos e teste T e Mann-Whitney para dados não paramétricos a 5% de significância ($p<0,05$). A análise estatística descritiva foi realizada utilizando o programa BioEstat 5.0 (Ayres et al, 2007).

4 RESULTADOS

4.1 Exame Clínico

No exame clínico, a maioria dos indivíduos positivos não apresentou alterações relevantes. Apenas cinco (36%) manifestaram sinais clínicos inespecíficos como prostração e anorexia (urubus 94, 97, 98, 99 e 100), sem outras alterações clínicas importantes.

Os valores médios de peso, temperatura e escore corporal entre indivíduos positivos e negativos foram comparados. No entanto, não apresentaram diferenças a 5% de significância ($p<0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Análise Estatística Descritiva dos parâmetros clínicos (peso, temperatura e escore corporal) de Urubus-preto (*Coragyps atratus*) negativos e positivos para *Hepatozoon* sp. LABVET - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultados	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Mín.	Máx.	<i>Coragyps atratus</i> *
Peso (Kg)	Negativo	6	1.827 ^a	0.247	0.101	1.470	2.135	1.7-2.3 kg
	Positivo	14	1.711 ^a	0.165	0.044	1.435	1.955	
Temperatura (°C)	Negativo	6	41.3 ^a	1.062	0.434	40	42.6	-
	Positivo	14	40.6 ^a	1.095	0.293	38.6	42.3	
Escore corporal	Negativo	6	3.2 ^a	0.41	0.17	2.5	3.5	-
	Positivo	14	3.0 ^a	0.37	0.10	2.5	3.5	

^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste ANOVA ou Mann-Whitney a 5% de significância ($p<0,05$). Kg: quilogramas; °C: graus celsius; Mín: mínimo; Máx: Máximo. *Carpenter; Harms, 2023.

4.2 Avaliação dos Esfregaços Sanguíneos

Quatro aves (20%) (Tabela 3), apresentaram inclusões no interior dos leucócitos (Figura 9). Os gametócitos intraleucocitários enquadraram-se nas características do gênero *Hepatozoon*, alguns gamontes foram observados em células rompidas (Figura 10), sendo impossível diferenciar o tipo celular envolvido. Os gamontes apresentaram o formato alongado com extremidades arredondadas, situados próximos aos lobos nucleares da célula hospedeira. O citoplasma do parasito variava de eosinofílico a basofílico. Foi observado o deslocamento do núcleo de alguns leucócitos parasitados.

Tabela 3. Presença ou ausência de inclusões em esfregaço sanguíneo, sugestivos de *Hepatozoon* sp. em Urubus-preto (*Coragyps atratus*), CETAS, Seropédica/RJ.

Animais (<i>Coragyps atratus</i>)	<i>Hepatozoon</i> sp. (inclusão)
Urubu 94	-
Urubu 95	-
Urubu 96	-
Urubu 97	-
Urubu 98	-
Urubu 99	-
Urubu 100	-
Urubu 101	+
Urubu 102	-
Urubu 103	-
Urubu 104	-
Urubu 105	-
Urubu 106	+
Urubu 107	-
Urubu 108	-
Urubu 109	-
Urubu 110	+
Urubu 111	-
Urubu 112	-
Urubu 113	+

(-): Negativo; (+): Positivo.

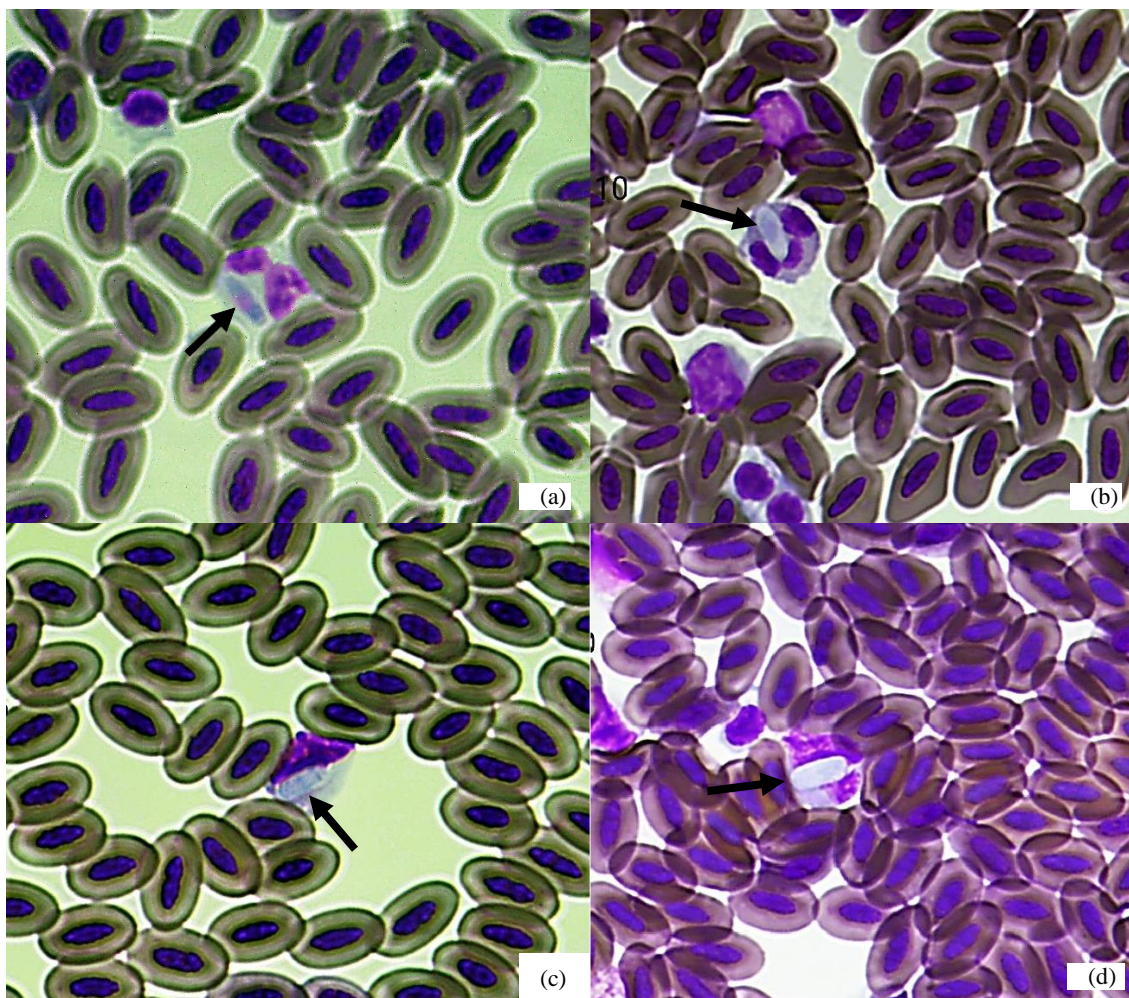


Figura 9. *Hepatozoon* sp.(seta) em esfregaço sanguíneo de Urubu espécie *Coragyps atratus*. (a) Gamonte no citoplasma de um monócito. (b) Deslocamento do núcleo de leucócito pelo gamonte. (c) Gamonte em citoplasma de linfócito. (d) Gamonte formato mais robusto no interior de um leucócito mononuclear. Coloração: Giemsa. Aumento 1000x. LABVET, Seropédica, 2023.

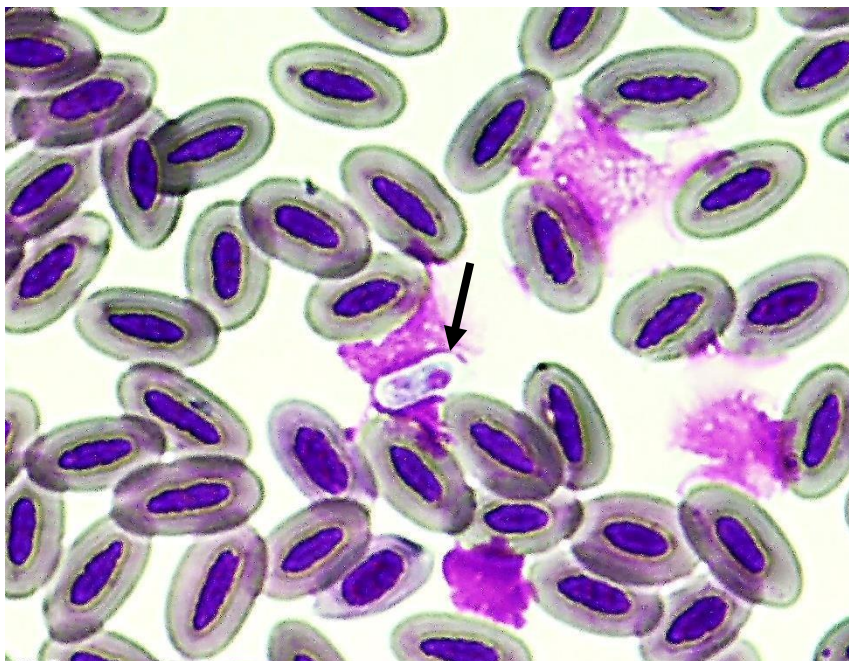


Figura 10. Esfregaço sanguíneo de Urubu espécie *Coragyps atratus*. Gamonte de *Hepatozoon* sp. (seta) observado em célula rompida, impossibilitando identificação do tipo celular. Coloração: Giemsa. Aumento 1000x. LABVET, Seropédica, 2023.

4.3 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR)

Foi realizada reação de PCR com base no gene 18S rRNA para agentes do gênero *Hepatozoon* das 20 aves amostradas no estudo, uma vez que todas as reações para o gene endógeno foram positivas, incluindo cinco amostras da medula óssea (MO) (relacionadas aos urubus 94, 97, 98, 99 e 100).

Onze urubus (55%) foram positivos para o gênero *Hepatozoon* (tabela 4) nas amostras obtidas do sangue total. A respeito das cinco reações realizadas perante MO, 3 (60%) foram positivas (urubu 94, 98 e 100), sendo estas 3 negativas em sangue total (tabela 4). Portanto, o percentual de positividade em urubus-preto para o gênero *Hepatozoon* relacionado aos dois tipos de amostras biológicas (sangue total e MO) foi de 70% (14/20).

Tabela 4. Resultados positivos em reações de PCR com base no gene 18S rRNA para agentes do gênero *Hepatozoon* obtidos de amostras de DNA extraídas de sangue total e medula em Urubus-preto (*Coragyps atratus*). CETAS, Seropédica/RJ.

Animais (<i>Coragyps atratus</i>)	Sangue total	Medula óssea (MO)
Urubu 94	-	+
Urubu 95	+	s/m
Urubu 96	+	s/m
Urubu 97	+	-
Urubu 98	-	+
Urubu 99	-	-
Urubu 100	-	+
Urubu 101	+	s/m
Urubu 102	+	s/m
Urubu 103	-	s/m
Urubu 104	+	s/m
Urubu 105	-	s/m
Urubu 106	+	s/m
Urubu 107	-	s/m
Urubu 108	+	s/m
Urubu 109	+	s/m
Urubu 110	+	s/m
Urubu 111	-	s/m
Urubu 112	-	s/m
Urubu 113	+	s/m

(-): Negativo; (+): Positivo; s/m: sem colheita de medula.

4.4 Análise Hematológica Urubus-preto (*Coragyps atratus*)

Os parâmetros hematológicos foram determinados separadamente para indivíduos negativos e positivos, no qual os animais positivos apresentaram valores médios de hematócrito ligeiramente menores do que os animais negativos, porém dentro do intervalo de referência (Tabela 5).

Verificou-se diferença significativa entre animais positivos e negativos apenas para os valores de concentração de hemoglobina globular média (CHCM), visto que os animais positivos apresentaram médias superiores aos negativos, porém, ainda dentro dos valores de referência reportados para a espécie. Os demais parâmetros não diferiram entre si a 5% de significância.

Os valores médios dos parâmetros hematológicos entre indivíduos positivos e negativos não apresentaram alterações discrepantes. No entanto, quando analisados individualmente observou-se resultados importantes para o grupo de animais positivos (Tabela 6 e 7). Pelo menos dois urubus apresentaram hematócrito abaixo do intervalo de referência para espécie (n=2; 14%; urubu 98 e 102). Um apresentou eritrocitose (urubu 100). 5/14 (36%; urubus 95, 100, 102, 109, 110 e 113) manifestaram eosinofilia e 8/14 apresentaram hiperproteinemia.

Tabela 5. Análise Estatística Descritiva dos parâmetros hematológicos de Urubus-preto (*Coragyps atratus*) negativos e positivos para *Hepatozoon* sp. LABVET - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Parâmetros hematológicos	Resultados	N	Média	Desv. padrão	Erro padrão	Mín.	Máx.	<i>Coragyps atratus</i> *
He (x10⁶ cel/μL)	Negativo	6	2.27 ^a	0.16	0.07	2	2.48	1.16–
	Positivo	14	2.46 ^a	0.53	0.14	1.8	3.74	2.48
Hb (g/dL)	Negativo	6	9.91 ^a	0.98	0.40	8.38	10.84	8.5–12.5
	Positivo	14	10.48 ^a	1.13	0.30	8.88	12.81	
Hematócrito (%)	Negativo	6	49.83 ^a	3.92	1.60	43	55	42.3–
	Positivo	14	47.93 ^a	5.24	1.40	37	58	54.5
VCM (fL)	Negativo	6	220.82 ^a	23.77	9.70	187.77	248.87	203.2–
	Positivo	14	202.23 ^a	42.42	11.34	117.65	263.68	402.6
CHCM (g/dL)	Negativo	6	19.90 ^a	1.49	0.61	17.1	21.21	17.4–
	Positivo	14	21.99 ^b	2.26	0.61	18.42	25.14	26.2
Leuc. Totais (cel/μL)	Negativo	6	10366.67 ^a	2459.81	1004.21	6800	13000	5930–
	Positivo	14	13678.57 ^a	4308.34	1151.45	6500	23000	27140
Heterófilos (μL)	Negativo	6	6389.33 ^a	1640.16	669.59	4148	8832	3400–
	Positivo	14	8271.21 ^a	2985.97	798.03	4875	14030	21580
Eosinófilos (μL)	Negativo	6	2154.50 ^a	1133.35	462.69	980	4030	0–3070
	Positivo	14	2953.64 ^a	1942.05	519.04	715	7511	
Basófilos (μL)	Negativo	6	0 ^a	0	0	0	0	0–250
	Positivo	14	9.29 ^a	34.74	9.29	0	130	
Linfócitos (μL)	Negativo	6	1518.83 ^a	418.28	170.76	1105	2048	190–
	Positivo	14	1933.64 ^a	1271.52	339.83	520	5278	5160
Monócitos (μL)	Negativo	6	304 ^a	312.85	127.72	85	910	0–1490
	Positivo	14	510.79 ^a	684.25	182.87	88	2760	
Trombócitos estimados (cel/μL)	Negativo	6	27168 ^a	5980.52	2441.54	20000	35000	-
	Positivo	14	25500 ^a	8777.16	2345.79	40000	12000	
PPT (g/dL) (Refratômetro)	Negativo	6	4.47 ^a	0.55	0.22	3.8	5.2	2,4–4,8
	Positivo	14	4.86 ^a	0.99	0.26	3	6.4	

^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste ANOVA e Mann-Whitney a 5% de significância (p<0,05). HE: hemácias; HB: hemoglobina; VCM: volume globular médio; CHCM: concentração de hemoglobina globular média; LEUC: leucócitos; PPT: Proteína plasmática total; N: número de *Coragyps atratus*; Desv: desvio. *Barbara et al., 2017.

Tabela 6. Parâmetros hematológicos e proteína plasmática total de urubus-preto (*Coragyps atratus*) (94 a 101) positivos para *Hepatozoon* sp. Seropédica 2023.

Parâmetros	U94	U95	U96	U97	U98	U100	U101	<i>Coragyps atratus</i> *
HE (10 ⁶ /μL)	1.89	2.2	2.2	2.01	2.13	2.65	2.44	1.16–2.48
Hb (g/dL)	11.22	11.4	11.29	12.81	8.04	11.22	11.14	8.5–12.5
HT (%)	48	50	46	53	41	58	48	42.3–54.5
VCM (fL)	253.93	227.27	209.09	263.68	192.49	218.87	196.72	203.2–402.6
CHCM (g/dL)	23.38	22.8	24.54	24.17	22.05	19.34	23.21	17.4– 26.2
Leucócitos Totais (cel/μL)	13000	23000	13800	6500	14500	8800	16000	5930–27140
Heter. (μL)	10010	14030	11040	4875	10585	5368	12000	3400–21580
Eosino (μL)	2340	3910	1104	715	2030	2728	1760	0–3070
Baso. (μL)	0	0	0	0	0	0	0	0–250
Linfo. (μL)	520	2300	690	650	1595	616	1760	190–5160
Mono. (μL)	130	2760	966	260	290	88	480	0–1490
Tromb. estimados (cel/μL)	25000	20000	15000	19000	25000	20000	40000	-
PPT (g/dL)	4	6.2	5.2	4	3	5	6.4	2,4–4,8

HE: hemácias; HB: hemoglobina; HT: hematócrito; VGM: volume globular médio; CHCM: concentração de hemoglobina globular média; LINFO: linfócitos; MONO: monócitos; HETER: heterófilos; EOSO: eosinófilos; BASO: basófilos; PPT: Proteína plasmática total; U: urubu.

*Barbara et al., 2017.

Tabela 7. Parâmetros hematológicos e proteína plasmática total de urubus-preto (*Coragyps atratus*) (102 a 113) positivos para *Hepatozoon* sp. Seropédica, 2023.

Parâmetros	U102	U104	U106	U108	U109	U110	U113	<i>Coragyps atratus</i> *
HE (10 ⁶ /μL)	1.3	3.04	2.27	1.8	3.74	2.79	2.94	1.16–2.48
Hb (g/dL)	8.20	9.76	9.25	9.65	11.06	9.94	10.11	8.5–12.5
HT (%)	37	53	50	47	44	46	50	42.3–54.5
VCM (fL)	160.87	174.34	220.26	261.11	117.65	164.87	170.07	203.2–402.6
CHCM (g/dL)	24	18.42	18.5	20.53	25.14	21.61	20.22	17.4– 26.2
Leucócitos Totais (cel/μL)	11500	12300	14500	9300	15000	20300	13000	5930–27140
Heter. (μL)	5520	7257	10295	4929	6600	7308	5980	3400–21580
Eosino. (μL)	4600	2091	1015	1767	5100	7511	4680	0–3070
Baso. (μL)	0	0	0	0	0	0	130	0–250
Linfo. (μL)	1265	2460	2755	2232	3000	5278	1950	190–5160
Mono. (μL)	115	492	435	372	300	203	260	0–1490
Tromb. estimados (cel/μL)	36000	12000	40000	20000	32000	27000	26000	-
PPT (g/dL)	5.4	5.6	5.8	3.8	4.4	5	4.2	2,4–4,8

HE: hemácias; HB: hemoglobina; HT: hematócrito; VGM: volume globular médio; CHCM: concentração de hemoglobina globular média; LINFO: linfócitos; MONO: monócitos; HETER: heterófilos; EOSO: eosinófilos; BASO: basófilos; PPT: Proteína plasmática total; U: urubu.

*Barbara et al., 2017.

5 DISCUSSÃO

Até o presente momento, não foi observado descrição de hematozoário do gênero *Hepatozoon* acometendo Urubus-preto (*Coragyps atratus*) em outros estudos. No entanto, Lucena (1941) descreveu *Haemogregarina pintoï* em urubus da espécie *Cathartes aura* e *Coragyps atratus*. Apesar de tratar-se de um gênero diferente, sabe-se que historicamente parasitos sanguíneos de anfíbios, répteis, aves e mamíferos também foram incluídos no gênero *Haemogregarina* como resultado da semelhança morfológica de gamontes dos diferentes gêneros do grupo (Mohammed; Mansour, 1959; Ball, 1967; Wozniak; Telford, 1991). Logo, não há como afirmar se os agentes descritos em 1941 pertenciam de fato ao gênero *Haemogregarina* ou se nos dias atuais seriam alocados em outro gênero, visto que com o advento da biologia molecular diversos parasitos foram renomeados e realocados taxonomicamente.

As espécies de abutres em todo o mundo desempenham um papel fundamental nos ecossistemas como necrófagos obrigatórios e, várias populações vem sofrendo declínios preocupantes (Ives et al., 2022). Portanto, desenvolver estudos que investiguem a saúde desses indivíduos é fundamental para os esforços de conservação.

Ives et al. (2022) realizaram uma revisão sistemática, determinando as causas de morbidade e mortalidade em espécies de abutres de vida livre em todo o mundo, onde apenas 33% (45/134) dos estudos abordaram casos relacionados a doenças infecciosas, sendo 6% (3/45) dos estudos sobre protozoários, explicitando as lacunas literárias relacionadas ao tema e a importância do presente estudo.

Apesar da hepatozoonose acometer hospedeiros aviários, ainda é considerada uma doença parasitária pouco conhecida (Ebani; Mancianti, 2022). Espécie de *Hepatozoon neophrontis* originalmente conhecido como *H. adiei* foi descrita por Bennett et al. (1992b) parasitando outras espécies de urubus, tratando-se de abutres do velho mundo (*Torgos tracheliotus* e *Gyps africanus* no Zimbábue, *Neophron percnopterus* do Tajiquistão). Apesar da espécie de *H. neophrontis* ser considerada por Bennett et al. (1992b) como um parasito disseminado entre os rapinantes, até o momento tal espécie não foi descrita parasitando urubus da Família Cathartidae.

Um estudo realizado por Wahl (2013), no noroeste da Costa Rica, descreveu elevada prevalência de *Plasmodium* e microfilárias em urubus-preto (*Coragyps atratus*), mesma espécie de urubu amostrada no presente estudo. Entretanto, não detectou presença de parasitos do gênero *Hepatozoon* nos indivíduos. O mesmo foi observado por Webb et al. (2005) e Greiner et al. (2011) em duas espécies de abutres do novo mundo, Urubus-de-cabeça-vermelha (*Cathartes aura*) e urubus-preto (*Coragyps atratus*). Webb et al. (2005) descreveram presença de microfilárias em um urubu-preto adulto, coinfeção entre filarídeos e *Haemoproteus* em um Urubu-de-cabeça-vermelha (*Cathartes aura*) jovem e, microfilárias em um indivíduo adulto também da espécie *Cathartes aura*. Já Greiner et al. (2011) relataram presença de uma nova espécie de *Haemoproteus* (*Haemoproteus catharti* n. sp.) em urubus-de-cabeça-vermelha (*Cathartes aura*) na Carolina do Sul. No entanto, nenhum dos autores citados identificaram o gênero *Hepatozoon* nestes hospedeiros.

Estudos responsáveis por retratarem prevalência de hematozoários em aves, apontam os gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* como os mais frequentemente encontrados parasitando esta classe (Peirce, 1989; Valkiunas, 2005; Atkinson et al., 2009; Vanstreels; Parsons, 2014; Chakarov; Blanco, 2021). Por outro lado, o atual estudo apresentou uma ocorrência global de 70% de infecção por *Hepatozoon* sp. detectada através de métodos moleculares em urubus-preto, de modo que tal discrepância pode estar associada ao

subdiagnóstico, na falta de investigação e inclusão de ensaios moleculares relacionados ao gênero *Hepatozoon* em hospedeiros aviários.

Outra explicação para o alto percentual detectado, pode estar relacionado às características alimentares dos abutres, uma vez que a transmissão do *Hepatozoon* esteja associada a ingestão direta do vetor cíclico, ou indiretamente através da ingestão/predação de um hospedeiro paratênico com cistos teciduais (Landau, 1973; Davies; Johnston, 2000; Sloboda et al., 2007; Karadjian et al., 2015).

Outros resultados que cabem ser discutidos, envolvem os diagnósticos moleculares dos diferentes métodos amostrais (sangue total e medula óssea), onde 11 (11/20; 55%) urubus apresentaram positividade para *Hepatozoon* na PCR diante das amostras obtidas do sangue total e, 3 dos cinco (3/5; 60%) animais que coletaram medula óssea pareada ao sangue total apresentaram positividade apenas na medula.

A positividade observada nas 3 amostras obtidas da medula óssea e negativas no sangue total pode ser explicada pela baixa concentração do parasito no sangue, uma vez que também não foram observados gamontes de *Hepatozoon* no esfregaço sanguíneo, o que pode indicar baixa parasitemia devido infecções crônicas (Jarvi et al., 2002).

A positividade nas amostras obtidas da medula pode estar relacionada também a fase de merogonia, uma vez que, Ebani e Mancianti (2022) descreveram que a merogonia do gênero *Hepatozoon* ocorre em diferentes tecidos (fígado, baço, medula óssea, gânglios linfáticos e intestino), o que pode indicar que este estágio ocorra na medula óssea das aves.

Stabler encontrou numerosos parasitos extracelulares em preparações de tecidos obtidos da medula óssea em um passeriforme da espécie *Hirundo pyrrhonota* fortemente infectado com *Hepatozoon atticorae* e, acreditou que estes poderiam se tratar de merozoítos desta espécie de *Hepatozoon* (Bennett; Peirce, 1989). Um estudo realizado em raposas-vermelhas de Portugal também detectou altos níveis de merontes na medula óssea de indivíduos infectados por *Hepatozoon* (Cardoso et al., 2014), reforçando a ideia de que a merogonia deste agente ocorra na medula óssea em certos hospedeiros vertebrados e, que este achado pode apontar a medula como parte de uma etapa do ciclo de vida de determinadas espécies de *Hepatozoon* aviários.

Esfregaços de sangue dos 20 urubus foram verificados e, detectadas inclusões intraleucocitárias sugestivas do gênero em 4 preparações (4/20; 20%). Merino et al. (2014) observaram inclusões em 31% dos esfregaços avaliados. No entanto, as espécies de *Hepatozoon* envolvida parasitavam tipos celulares diferentes e, tratavam-se de aves marinhas, relacionadas à família Hydrobatidae (*Oceanodroma leucorhoa* e *Oceanodroma melania*).

Esse percentual ligeiramente mais elevado descrito por Merino et al. (2014) pode ser explicado, pelo fato de que as espécies de *Hepatozoon* relatadas foram responsáveis por infectarem apenas hemácias. No presente estudo, os gametócitos parasitaram os leucócitos mononucleares, células estas, responsáveis pela defesa do organismo, por destruírem microrganismos invasores, além de desempenharem importante papel imunológico (Dieterien-lievre, 1988; Almosny; Monteiro, 2007; Campbell, 2014). Logo, acredita-se que tais células puderam atuar mais prontamente controlando e reduzindo a parasitemia.

Outra explicação plausível pode estar relacionada as próprias características do hospedeiro. Sabe-se que os urubus são aves muito resistentes a microrganismo patogênicos (Carvalho et al., 2003; Roggenbuck et al., 2014; Blumstein et al., 2017; Mendoza et al., 2018; Plaza et al., 2020), o que também pode explicar a baixa parasitemia, devido a capacidade imune e cronificação da doença.

O maior percentual de indivíduos positivos no diagnóstico molecular quando comparado a avaliação microscópica também foi observada por Jarvi et al. (2002) em passeriformes infectados experimentalmente por *Plasmodium relictum* e Merino et al. (2014) em pétreus infectados por uma nova espécie de *Hepatozoon*. Diversos estudos têm demonstrado, que a PCR é mais sensível em detecções de hemoparasitos no sangue de aves (Ricklefs; Fallon,

2002; Waldenström et al., 2004; Ribeiro et al., 2005) e como citado anteriormente, pode estar relacionado a infecções crônicas.

No exame clínico os animais não apresentaram sinais clínicos importantes e quando comparado os valores médios dos parâmetros estabelecidos (peso, temperatura e escore corporal) entre os indivíduos positivos e negativos, não foram observadas diferenças a 5% de significância ($p < 0,05$). Segundo Bennett et al. (1992b) a maioria das infecções causadas pelo gênero *Hepatozoon* são extremamente leves. No entanto, pouco se sabe sobre a virulência destes parasitos em aves (Valkiūnas et al., 2016).

Um surto de hepatozoonose fatal em aves da espécie *Grus monacha* mantidos sob cuidados humanos foi relatado no Japão (Shimizu et al. 1987), portanto espécies aviárias de *Hepatozoon* podem causar doença em determinadas populações susceptíveis.

Apesar dos indivíduos não apresentarem alterações clínicas relevantes, os parâmetros hematológicos sofreram algumas alterações, principalmente quando observados os resultados dos animais positivos individualmente.

Dois urubus apresentaram anemia (14%; urubu 98 e 102), um apresentou eritrocitose (7%; urubu 100), 5/14 (36%; urubus 95, 100, 102, 109, 110 e 113) apresentaram eosinofilia e 8/14 (57%) hiperproteinemia (urubus 95, 96, 100, 101, 102, 104, 106 e 110).

É importante ressaltar que os parâmetros hematológicos utilizados como referência no trabalho, tratam-se de uma pesquisa executada em urubus da mesma espécie (*Coragyps atratus*), porém amostrados em estados diferentes (áreas urbanas de São Paulo) (Barbara et al., 2017). Sabe-se que tais valores podem apresentar ampla variação devido à influência de fatores intrínsecos e extrínsecos e, em geral, estão sujeitos a extensa variabilidade, resultante de diferentes ambientes, regiões, alimentação e práticas de manejo (Campbell, 2014). Logo, os valores de referência para animais silvestres devem ser utilizados apenas como orientações.

Embora as alterações hematológicas observados nos urubus positivos possam estar relacionadas a infecção por *Hepatozoon*, não há como afirmar, uma vez que tal assunto, seja insuficientemente estudado (Valkiūnas et al., 2016) e outros patógenos não foram investigados. Mesmo que o gênero *Hepatozoon* esteja amplamente distribuído entre todos os grupos de tetrápodes, estudos sistemáticos e moleculares são necessários para alcançar o conhecimento completo da hepatozoonose aviária (Ebani; Mancianti, 2022).

Estudos sobre hepatozoonose em cães, descreveram que as variações hematológicas estão intimamente relacionadas a parasitemia, resposta imunológica e a presença ou não de infecções coexistentes no hospedeiro (Mundim et al., 2008; Gomes et al., 2010; Chhabra et al., 2013). Dados publicados por Baneth e Weigler (1997), Gavazza et al. (2003), Kaur et al. (2012) e Chhabra et al. (2013), identificaram anemia como achado hematológico em cães com hepatozoonose, assim como observado em dois urubus do presente estudo. Entretanto, por tratarem-se de classes e de espécies de *Hepatozoon* diferentes, pode-se apenas sugerir tal associação.

O aumento de proteína plasmática total em 57% dos urubus positivos pode estar relacionado a desidratação, assim como a eritrocitose observada no indivíduo 100, uma vez que o mesmo tenha apresentado contagem de hemácias, percentual de hematócrito e proteína plasmática acima do intervalo de referência (Campbell, 2014).

Segundo Harris (2011) e Simoni (2013) hiperproteinemia pode ser visto em aves desidratadas ou pelo aumento de globulinas, porém, não foram observadas alterações morfológicas leucocitárias, ou mesmo, aumento da contagem total destas células que indicassem processos inflamatórios preexistentes. Logo, acredita-se que a causa da hiperproteinemia observada nestes indivíduos esteja relacionada a desidratação.

A desidratação causa hemoconcentração e aumento do volume globular (Campbell, 2014), o que pode mascarar o grau de anemia dos indivíduos avaliados. Portanto, os oito indivíduos que apresentaram hiperproteinemia poderiam estar com o hematócrito menor do que

efetivamente verificado e mais indivíduos positivos poderiam ter apresentado anemia no estudo.

A eosinofilia observada nos cinco indivíduos positivos pode estar associado a hepatozoonose. No entanto, é difícil interpretar a causa de eosinofilia periférica em aves, pois a função exata dos eosinófilos nesses animais não é bem conhecida, possuindo um papel importante na hipersensibilidade tipo IV, diferente em mamíferos (Campbell, 2014).

Estudos utilizando antígenos parasitários em aves não conseguiram induzir um quadro de eosinofilia periférica, apesar de já ter sido registrado quadro de eosinofilia associado à infestação gastrointestinal por nematódeos (Maxwell, 1980). Portanto, Campbell (2014) relata que a eosinofilia periférica em aves pode estar fracamente relacionada a resposta ao parasitismo interno ou externo ou à exposição a antígenos desconhecidos.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que os urubus-preto (*Coragyps atratus*) provenientes do CETAS do Rio de Janeiro apresentaram alta ocorrência (70%) de infecção para hematozoários do gênero *Hepatozoon*.

Além disso, a utilização de dois métodos diagnósticos (microscópico e molecular) e a inclusão de métodos amostrais distintos (sangue e medula óssea) foram responsáveis por aumentar a eficácia de detecção de *Hepatozoon* sp. nos indivíduos estudados.

Alterações laboratoriais como anemia e eosinofilia foram manifestadas em alguns urubus positivos para o gênero *Hepatozoon*. Embora sejam necessários mais estudos referentes as alterações hematológicas e ao diagnóstico do hematozoário em questão.

Ademais, os resultados oferecem oportunidades para pesquisas futuras, direcionadas as consequências, prevalência e diversidade do gênero *Hepatozoon* em abutres do novo mundo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A.S.; SAEED, M.A.; RASHID, I.; ASHRAF, K.; SHEHZAD, W.; TRAUB, R.J.; Baneth, G.; Jabbar, A. Molecular characterization of *Hepatozoon canis* from farm dogs in Pakistan. **Parasitol. Res.** v.117, p.1131–1138, 2018.

ALLEN, K. E.; JOHNSON, E. M.; LITTLE, S. E. *Hepatozoon* spp infections in the United States. **Vet. Clin. N. Am Small Anim Pract.** v.41, p.1221–1238, 2011.

ALMOSNY, N. R. P. Patologia Clínica de invertebrados ectotérmicos. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2014. p. 1736-1766.

ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, A.O. Patologia Clínica. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 939-966.

AMATO, J. F. R.; AMATO, S. B. Técnicas gerais para coleta e preparação de helmintos endoparasitos de aves. In: MATTER, S. V.; STRAUBE, F. C.; ACCORDI, I. A.; PIACENTINI,

V. Q.; CÂNDIDO-Jr, J. F. **Ornitologia e conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 367-394.

ARAD, Z.; BERNSTEIN, M. H. Temperature regulation in turkey vultures. **The Condor**, v. 90, n. 4, p. 913-919, 1988.

ARAD, Z.; MIDTGARD, U.; BERNSTEIN, M. H. Thermoregulation in turkey vultures: vascular anatomy, arteriovenous heat exchange, and behavior. **The Condor**, v. 91, n. 1, p. 505-514, 1989.

ARIZZA, V.; SACCO, F.; RUSSO, D.; SCARDINO, R.; ARCULEO, M.; VAMBERGER, M.; MARRONE, F. The good, the bad, and the ugly: *Emys trinacris*, *Placobdella costata* and *Haemogregarina stepanowi* in Sicily (Testudines, Annelida and Apicomplexa). **Folia Parasit.** v.63, p.29, 2016.

ARRIERO, E.; MØLLER, A.P. Host ecology and life-history traits associated with blood parasite species richness in birds. **Journal of Evolutionary Biology**. v.21, p.1504-1513, 2008.

ATKINSON, C.T.; THOMAS, N.J.; HUNTER, D.B. **Parasitic Diseases of Wild Birds**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008.

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

AYRES, M. et al. Bioestat 5.0 **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: IDSM, 2007.

BALL, G.H. Some Blood Sporozoans from East African Reptiles. **The Journal of Protozoology**. v.14, p. 198-210, 1967.

BALL, H. G.; CHAO, J.; TELFORD JR., S. R. Hepatozoon fusifex sp. n., a hemogregarine from Boa constrictor producing marked morphological changes in infected erythrocytes. **Journal of Parasitology**, v.55, n.4, p.800-813, 1969.

BANETH, G.; WEIGLER, B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.11, p.365-370, 1997.

BANG, B.G. The nasal organs of the black and Turkey vultures: a comparative study of the cathartid species *Coragyps atratus atratus* and *Cathartes aura septentrionalis* (with notes on *C. aura falklandica*, *Pseudogyps bengalensis* and *Neophron percnopterus*). **J. Morphol.** v.115, p.153-184, 1964.

BARBARA, J. C. A. **Avaliação do perfil sanitário de urubu-de-cabeça-preta (*Coragyps atratus*) em ambiente urbano**. 2015. 66 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARBARA, J. C. A.; FERREIRA, V. L.; GUIDA, F. J. V.; PRIOSTE, F. E. S.; MATUSHIMA, E. R.; RASO, T. F. Hematologic reference intervals for wild Black vultures (*Coragyps atratus*). **Vet. Clin. Pathol.** v.46, p.1–5, 2017.

- BARBOSA, A., J.; BENZAL, V.; VIDAL, V.; D'AMICO, N.; CORIA, J.; DIAZ, M.; MOTAS, M. J.; PALACIOS, J. J.; CUERVO, J.; ORTIZ ET AL. Seabird ticks (*Ixodes uriae*) distribution along the Antarctic Peninsula. **Polar Biology** v.34 p.1621–1624, 2011.
- BARRACLOUGH, R.K.; ROBERT, V.; PEIRCE, M.A. New species of haematozoa from the avian families Campephagidae and Apodidae. **Parasite**. v.15, p.105–110, 2008.
- BARTA, J.R. Phylogenetic analysis of the Class Sporozoa (Phylum Apicomplexa Levine 1970): Evidence for the independent evaluation of heteroxenous life cycles. **J. Parasitol.** v.75, p.195–206, 1989.
- BASHAR, A. R.; ABDEL-GHAFFAR, F. A.; SHAZLY, M. A. Life cycle of Hepatozoon mehlhorni sp. nov. in the viper *Echis carinatus* and the mosquito *Culex pipiens*. **Parasitology Research**, v.77, n.5, p.402–410. 1991.
- BENNETT G. F., PEIRCE M. A., EARLÉ R. A. An annotated checklist of the valid avian species of Haemoproteus, Leucocytozoon (Apicomplexa: Haemosporida) and Hepatozoon (Apicomplexa: Haemogregarinidae). **Syst. Parasitol.** v.29, p.61–73, 1994.
- BENNETT, G. F., PEIRCE, M. A. Leucocytozoids of seven Old World passeriform families. **Journal of Natural History**. v.26, p.693–707, 1992.
- BENNETT, G. F.; BISHOP, M. A; PEIRCE, M. A. Checklist of the avian species of *Plasmodium* Marchiafava and Celli, 1885 (Apicomplexa) and their distribution by avian family and Wallacean life zones. **Systematic Parasitology**. v.26, p.171–179, 1993a.
- BENNETT, G. F.; EARLÉ, R. A.; PEIRCE, M. A. New species of Hepatozoon (Apicomplexa: Haemogregarinidae) and a redescription of Hepatozoon neofrontis (Todd and Wohlbach, 1912) Wenyon, 1926. **Systematic Parasitology**, v.23, p.183–193, 1992a.
- BENNETT, G. F.; PEIRCE, M.A. *Hepatozoon parus* n. sp. from the Paridae and redescription of *H. atticorae* (de Beaufort 1911) Hoare, 1924 from the Hirundinidae. **Canadian Journal of Zoology**. v.67, p.2859–2863, 1989.
- BENNETT, G. F.; PENZHORN, B. L. *Ornithodoros peringueyi* (Argasidae) and *Xenopsylla trispinis* (Siphonaptera), probable intermediate host of *Hepatozoon atticorae* of the South African Cliff Swallow, *Hirundo spilodera*. **Canadian Journal Zoology**. v.70, p.188–190, 1991.
- BENNETT, G.F.; EARLÉ, R.A.; PEIRCE, M.A. New species of avian Hepatozoon and a redescription of *Hepatozoon neofrontis* (Todd & Wolbach, 1912) Wenyon, 1926. **Systematic Parasitology**. v.23, p.183–193, 1992b.
- BENNETT, G.F.; EARLÉ, R.A.; SQUIRES-PARSONS, D. Additional new species of Haemoproteus, Hepatozoon and Leucocytozoon from South African birds. **S. Afr. Wildl. Res.** v.25, p.1–7, 1995.
- BENNETT, G.F.; MONTGOMERIE, R.; SEUTIN, G. Scarcity of haematozoa in birds breeding on the arctic tundra of North America. *Condor*. 1992, v.94, p.289–292, 1992.

BENNETT, G.F.; PEIRCE, M.A. Hepatozoon parus n.sp. from the Paridae and redescription of H. atticorae (de Beaufort Aragão, 1911) Hoare, 1924 from the Hirundinidae. *Can. J. Zool.* 1989, v.67, p.2859–2863, 1989.

BENNETT, G.F.; PEIRCE, M.A.; ASHFORD, R.W. Avian Haematozoa: mortality and pathogenicity. **Journal of Natural History**. v.27, p.993-1001, 1993b.

BHUSRI, B.; SARIYA, L.; MONGKOLPHAN, C.; SUKSAI, P.; KAEWCHOT, S.; Changbunjong, T. Molecular characterization of Hepatozoon felis in Rhipicephalus sanguineus ticks infested on captive lions (Panthera leo). **J. Parasit. Dis.** v.41, p.903–907, 2017.

BIEDRZYCKA, A.; KLOCH, A.; MIGALSKA, M.; BIELANSKI, W. Molecular characterization of putative Hepatozoon sp. from the sedge warbler (Acrocephalus schoenobaenus). **Parasitology**, v.140, p.695–698, 2013.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2016. Coragyps atratus. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22697624A93624950. Available in: <<https://www.iucnredlist.org/species/22697624/93624950>>. Accessed on 17 March 2024.

BJÖERSDORFF, A.; BERGSTROM, S.; MASSUNG, R.F.; HAEMIG, P.D.; OLSEN, B. Ehrlichia-infected ticks on migrating birds. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p.877–879, 2001.

BLUMSTEIN, D. T.; RANGCHI, T. N.; BRIGGS, T.; DE ANDRADE, F. S.; NATTERSON-HOROWITZ, B. A Systematic Review of Carrion Eaters' Adaptations to Avoid Sickness. **J. Wildl. Dis.** v.53, p.577–581, 2017.

BRASIL. Lei N° 5197 de 3 de Janeiro de 1967, art1°. [S.I.:s.n], 1967. Disponível em:<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l5197.htm>. Acesso em: 06 março. 2024.

BRASIL. Lei N° 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. [S.I.:s.n], 1998. Disponível em:<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9605.htm>. Acesso em: 06 março. 2024.

BRAY, R.S. A check-list of the parasitic protozoa of West Africa with some notes on their classification. **Bull. Inst. Fr. Afr. Noire**. v.26, p.238–315, 1964.

BRITO, G. R. R. **Análise filogenética de Cathartidae (Aves) com base em caracteres osteológicos**. 2008. 331 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BUSH, A.O.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **The Journal of Parasitology**, v.83, n.4, p. 575–583, 1997.

BYRNE, M. E.; HOLLAND, A. E.; TURNER, K. L.; et al. Using multiple data sources to investigate foraging niche partitioning in sympatric obligate avian scavengers. **Ecosphere**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2019.

CAMPBELL, M. O. Systematic list of New World vultures. In: CAMPBELL, M. O. **Vultures: Their evolution, ecology and conservation**. Boca Raton: CRC Press, 2015. 374p.

CAMPBELL, T.W. Hematologia de Aves. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2014. p. 205-238.

CARDOSO, L.; CORTES, H. C. E.; EYAL, O.; REIS, A.; LOPES, A. P.; VILA-VIÇOSA, M. J.; RODRIGUES, P. A.; BANETH, G. Molecular and histopathological detection of *Hepatozoon canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. **Parasites & Vectors**, v.7, p.113, 2014.

CARPENTER, J.; HARMS, C. A. **Exotic animal formulary**. 6. ed. North Carolina, USA: Elsevier Science Health Science Division, 2023. 1307p.

CARVALHO, L. R.; FARIAS, L.M.; NICOLI, J.R.; SILVA, M.C.F.; CORSINO, A.T.S.M.; LIMA, L.A.; REDONDO, R.A.F.; FERREIRA, P.C.P.; PINTO, M.E.B.M. Dominant culturable bacterial microbiota in the digestive tract of the American black vulture (*Coragyps atratus* Bechstein 1793) and search for antagonistic substances. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.218- 224. 2003.

CHAGAS, C. R. F. **Plasmodium spp. em aves silvestres da Fundação Parque Zoológico de São Paulo: identificação de espécie por microscopia e sequenciamento do gene mitocondrial citocromo b**. 2016. 155 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHAGAS, C. R. F.; HARL, J.; PREIKŠA, V.; BUKAUSKAITE, D.; ILGUNAS, M.; WEISSENBOCK, H.; VALKIUNAS, G. LANKESTERELLA (Apicomplexa, Lankesterellidae) Blood Parasites of Passeriform Birds: Prevalence, Molecular and Morphological Characterization, with Notes on Sporozoite Persistence In Vivo and Development In Vitro. **Animals**. v.18, p.1451, 2021.

CHAKAROV, N.; BLANCO, G. Blood Parasites in Sympatric Vultures: Role of Nesting Habits and Effects on Body Condition. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. v. 18, p.2431, 2021.

CHHABRA, S.; UPPAL, S.K.; DAS SINGLA, L. Retrospective study of clinical and hematological aspects associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in Ludhiana, Punjab, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v.3, p.483-486, 2013.

CLARK, G. M. *Hepatozoon griseisciuri* n. sp.; a new species of *Hepatozoon* from the Grey squirrel (*Sciurus carolinensis* Gmelin, 1788), with studies on the life cycle. **Journal of Parasitology**. v.44, p.52-63, 1958.

CLARK, K. A.; ROBINSON, R.M.; WEISHUHN, L.L.; GALVIN, T.J.; HORVATH, K. *Hepatozoon procyonis* infections in Texas. **Journal of Wildlife Diseases**. v.9, p.182-193, 1973.

CLARK, P.; BOARDMAN, W. S. J.; RAIDAL, S. R. **Atlas of Clinical Avian Hematology**. Blackwell, 2009.

CORREIA, A. H. P. et al. The value of per-operative cytological exam in neurosurgeries. **J Bras Patol Med Lab**. v.41, p.209-214, 2005.

DAVIES, A.J.; JOHNSTON, M.R.L. The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibians and reptiles. **Advances in Parasitology**. v.45, p.1–107, 2000.

DE GARINE-WICHATITSKY, M., A.; CARON, R.; KOCK, R.; TSCHOPP, M.; MUNYEME, M.; HOFMEYR, A.M. A review of bovine tuberculosis at the wildlife-livestockhuman interface in sub-Saharan Africa. **Epidemiology and Infection**. v.141, p.1342–1356, 2013.

DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; CABEZAS-CRUZ, A.; Brey, R. Carrapatos voadores: associações desenvolvidas no passado que constituem um risco de propagação de doenças infecciosas. **Vetores parasitas**. v.8 p.538, 2015.

DE VAULT, T. L.; BRADLEY, D. R. I.; BRISBIN, J. R. L.; et al. Home ranges of sympatric black and turkey vultures in South Carolina. **The Condor**, v. 106, n. 3, p. 706-711, 2019.

DEL CERRO, S.; MERINO, S.; MARTÍNEZ, de la P. J.; LOBATO, E.; RUIZ, DE C.R.; RIVERO, A.J.; MARTÍNEZ, J.; MORALES, J.; TOMÁS, G.; MORENO, J. Carotenoid-based plumage colouration is associated with blood parasite richness and stress protein levels in blue tits (*Cyanistes caeruleus*). **Oecologia**. v.162, p.825-835, 2010.

DESPOMMIER, D. D.; GRIFFIN, D. O.; GWADZ, R. W.; HOTEZ, P.J.; KNIRSCH, C. A. **Parasitic diseases**. 6. ed. Nova Iorque: Parasites Without Borders, 2017. 590p.

DESSER, S. S. The haemogregarinidae and lankesterellidae. In: J.P. KREIER, **Parasitic Protozoa**. The Second Edition. Academic Press: San Diego, 1993, p. 247–272.

DESSER, S.S.; HONG, H.; MARTIN, D.S. The life history, ultrastructure, and experimental transmission of *Hepatozoon catesbianae* n. comb., an apicomplexan parasite of the bullfrog, *Rana catesbeiana* and the mosquito, *Culex territans* in Algonquin Park, Ontario. **Journal of Parasitology**. v.81, p.212-222, 1995.

DIETERIEN-LIEVRE, F. Birds. In: RAWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A. **Vertebrate Blood Cells**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1988. p.257–336.

EBANI, V. V.; MANCIANTI, F. Potential Role of Birds in the Epidemiology of *Coxiella burnetii*, *Coxiella*-like Agents and *Hepatozoon* spp. **Pathogens**, v.11, p.298, 2022.

ENGSTRÖM, H.; DUFVA, R.; OLSSON, G. Absence of haematozoa and ectoparasites in a highly sexually ornamented species, the crested auklet. **Waterbirds**. v.23, p.486–488, 2000.

FELDMAN, R.A.; FREED, L.A.; CANN, R.L. A PCR Test for Avian Malaria in Hawaiian birds. **Molecular Ecology**. v.4, p.663-73, 1995.

FERGUSON-LEE, J.; CHRISTIE, D. A. **Raptors of the world**. Boston/New York: Houghton Mifflin Company. 2001. 992p.

FIGUEROLA, J. Effects of salinity on rates of infestation of waterbirds by haematozoa. **Ecography**. v.22, p.681–685, 1999.

FIGUEROLA, J.A.; VELARDE, A.; BERTOLERO, A.; CERDA, F. Abwesenheit von Haematozoa bei einer Brutpopulation des Seeregenpfeifers *Charadrius alexandrinus* in Nordspanien. **Journal für Ornithologie**. v.137 p.523-525, 1996.

- FREITAS, M.F.L.; OLIVEIRA, J.B.; CAVALCANTI, M.D.B.; LEITE A.D.; MAGALHÃES, V.S.; OLIVEIRA, R.A.; SOBRINHO A.E. Parasitos gastrointestinais de aves silvestres em cativeiro em el estado de Pernambuco, Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 57, p. 50-54, 2002.
- FURMAN, D. P. *Hepatozoon balfouri* (Laveran, 1905): Sporogonic cycle, pathogenesis, and transmission by mites to jerboa hosts. **Journal of Parasitology**. v.52, p.373-382, 1966.
- GARNHAM, P.C.C. **Malaria parasites and other haemosporidia**. Blackwell, Oxford, 1966.
- GAVAZZA, A.; BIZZET, M.; PAPINI, R. Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. **Revue de Médecine Vétérinaire**. v.154, p.565-571, 2003.
- GÖBEL, E.; KRAMPITZ, H.E. Histologische Untersuchungen zur Gamogonie und Sporogonie von *Hepatozoon erhardovae* in experimentell infizierten Rattenflihen (*Xenopsylla cheopis*). **Zeitschrift für Parasitenkunde**. v.67, p.261-271, 1982.
- GOMES, P.V.; MUNDIM, M.J.; MUNDIM, A.V.; DE ÁVILA, D.F.; GUIMARÃES, E.C.; CURY, M.C. Occurrence of *Hepatozoon* sp. in dogs in the urban area originating from a municipality in southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.74, p.155–161, 2010.
- GREINER E. C.; MUNDY, P. J. Hematozoa from Southern African Vultures, with a Description of *Haemoproteus janovyi* sp. n. **The Journal of Parasitology**, v. 65, p. 147-153, 1979.
- GREINER, E. C.; FEDYNICH, A. M.; WEBB, S. L.; DeVAULT, T. L.; RHODES, O. E. Hematozoa and a new haemoproteid species from Cathartidae (new world vulture) in South Carolina. **J. Parasitol.** v.97, p. 1137–1139, 2011.
- GREINER, E. C.; RITCHIE, B. W. Parasites. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian medicine: principles and application**. Lake Worth, Florida: Wingers Publishing, 1994. p. 1007 – 1029.
- GRESPLAN, A; RASO, T. F. Psittaciformes (Araras, Papagaios, Periquitos, Calopsitas e Cacatuas). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca. 2014. p. 614-656.
- HAKKARAINEN, H.; ILMONEN, P.; KOIVUNEN, V.; KORPIMAKI, E. Blood parasites and nest defense behaviour of Tengmalm's owls. **Oecologia**. v.114, p.574-577, 1998.
- HAKLOVÁ-KOCÍKOVÁ, B.; HIŽNANOVÁ, A.; MAJLÁTH, I.; RACKA, K.; HARRIS, D.G.; Földvári, G. Molecular characterization of *Karyolysus*– a neglected but common parasite infecting some European lizards. **Parasite Vector**. v.7, p.555, 2014.
- HANNOVER, T. H. **Studies on Avian Haematozoa in Australian Birds**. 2000. 203f. Dissertação - Aus dem Queensland Museum, Brisbane, dem Department of Microbiology and Parasitology, The University of Queensland, Brisbane, Australia.
- HARMELIN, A.; DUBEY, J. P.; YAKOBSON, B.; NYSKA, A.; ORGAD, U. Concurrent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. **Veterinary Parasitology**. v.43, p.131-136, 1992.

HARRIS, D. J. Testes clínicos. In: TULLY, T.; JONES, A.; DORRESTEIN, G. M. **Clínica de aves**. Elsevier Brasil, 2011, p. 68-74.

HARRIS, D. J.; MAIA, J. P. M. C.; PERERA, A. Molecular characterization of Hepatozoon species in reptiles from the Seychelles. **J. Parasitol.** v.97, p.106–110, 2011.

HAYES, P.M.; SMIT, N.J. Molecular insights into the identification and phylogenetics of the cosmopolitan marine fish blood parasite, *Haemogregarina bigemina* (Adeleorina: Haemogregarinidae). **Int. J. Parasitol. Parasites. Wildl.** v.8, p.216–220, 2019.

HENNING, L.; FELGER, I.; BECK, H. P. Rapid DNA extraction for molecular epidemiological studies of malaria. **Acta Tropica.** v.72, p.149-55, 1999.

HOARE, C. A. *Hepatozoon adiei*, n. sp., a blood parasite of an Indian eagle. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** v.18, p.63-66, 1924.

HOARE, C. A. On protozoal blood parasites collected in Uganda, with an account of the life cycle of the crocodile haemogregarine. **Parasitology**, v. 24, p. 210-224, 1932.

HOOGSTRAAL, H. The life cycle and incidence of *Hepatozoon balfouri* (Laveran, 1905) in *Egyptian jerboas* (*Jaculus* spp.) and mites (*Haemolaelaps aegyptius* Keegan, 1956). **Journal of Protozoology.** v.8, p.231-248, 1961.

HÖRAK, P.; OTS, I.; VELLAU, H.; SPOTTISWOODE, C.; MØLLER, A. P. Carotenoid-based plumage coloration reflects hemoparasite infection and local survival in breeding great tits. **Oecologia** v.126, p.166–173, 2001.

HOUSTON, D. C. Family Cathartidae (New World vultures) In: DEL HOYO, J.; ELLIOT, A. & SARGATAL, J. **Handbook of the birds of the world**. New World vultures to Guineafowl. Barcelona, Lynx Edicions. 1994. p. 24-41.

HOUSTON, D.C. Scavenging efficiency of turkey vultures in tropical forest. **The Condor.** v.88, p.318–323, 1986.

HRAZDILOVÁ, K.; ČERVENÁ, B.; BLANVILLAIN, C.; FORONDA, P.; MODRÝ, D. Quest for the type species of the genus *Hepatozoon*—phylogenetic position of hemogregarines of rats and consequences for taxonomy. **Systematics and Biodiversity**, v. 19, n. 6, p. 622-631, 2021.

HRAZDILOVÁ, K.; ČERVENÁ, B.; BLANVILLAIN, C.; FORONDA, P.; MODRÝ, D. Quest for the type species of the genus *Hepatozoon*—phylogenetic position of hemogregarines of rats and consequences for taxonomy. **Systematics and Biodiversity**, v. 19, n. 6, p. 622-631, 2021.

IBAMA, Instrução Normativa IBAMA nº 179, 2008. Disponível em: <<https://www legisweb.com.br/legislacao>>. Acesso em: 05 março 2024.

IBAMA, Instrução Normativa IBAMA nº 23, 2014. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/32094529/do1-2015-01-02-instrucao-normativa-n-23-de-31-de-dezembro-de-2014-32094512>. Acesso em: 05 março 2024.

IVES, A. M.; BRENN-WHITE, M.; BUCKLEY, J. Y.; KENDALL, C. J.; WILTON, S.; DEEM, S. L. A Global Review of Causes of Morbidity and Mortality in Free-Living Vultures. **EcoHealth**, v.19, p.40–54, 2022.

JARVI, S. I.; SCHULTZ, J. J.; ATKINSON, C. T. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 153-158, 2002.

JÒZSEF, Ö.; DARKO, M.; MILOS, V.; BOJAN, G.; JEVROSIMA, S.; DEJAN, K.; SANJA, A.-K. Cytological and molecular identification of Haemogregarina stepanowi in blood samples of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) from quarantine at Belgrade Zoo. **Acta Vet.-Beograd**. v.65, p.443–453, 2015.

KARADJIAN, G.; CHAVATTE, J. M.; LANDAU, I. Systematic revision of the adeleid haemogregarines, with creation of Bartazoon n. g., reassignment of Hepatozoon argantis Garnham, 1954 to Hemolivia, and molecular data on Hemolivia stellata. **Parasite**. v.22, p.31, 2015.

KAUR, P.; DESHMUKH, S.; SINGH, R.; BANSAL, B. K.; RANDHAWA, C. S.; SINGLA, L. D. Para-clinico-pathological observations of insidious incidence of canine hepatozoonosis from a mongrel dog: a case report. **Journal of Parasitic Diseases**. v.36, p.135–138, 2012.

KNOWLES, S. C.; PALINAUSKAS, V.; SHELDON, B. C. Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: experimental evidence from a wild bird population. **Journal of Evolutionary Biology**. v.23, p.557-569, 2010.

KRAMPITZ, H. E. Über das Vorkommen und Verhalten von Haemococcidien der Gattung *Hepatozoon* Miller, 1908 (Protozoa, Adeleidea) in mittel- und siideuropiischen Siugern. **Acta Tropica Basel**. v.21, p.114-154, 1964.

KRUSZEWICZ, A. G.; DYRCZ, A. Hepatozoon kabeeni n. sp. (Protozoa: Apicomplexa; Hemogregarina) from the sedge warbler, *Acrocephalus schoenobaenus* (Aves: Passeriformes). **Wiad Parazytol**, v.46, p.507–510, 2000.

KUDO, R. R. **Protozoology**, 5th. ed. Illinois: Charles C. Thomas, 1977, 1174p.

LANDAU, I. A comparison of the life cycles of Toxoplasma and Hepatozoon, with reference to the general phenomenon and the role of cyst formation in the Coccidia. **Ann. Trop. Med. Parasitol**. v.67, p.403–407, 1973.

LEVINE, N. D. Some corrections in hemogregarine (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **Journal of Protozoology**. v.29, p.601-603, 1982.

LITTLE, R. M.; EARLE, R. A. Lack of avian haematozoa in the Phasianinae of Robben Island. **Ostrich**. v.65, p.343-344, 1994.

LITTLE, R. M.; EARLE, R. A. Sandgrouse (Pterocleididae) and Sociable Weavers *Philetarius socius* lack avian haematozoa in semi-arid regions of South Africa. **Journal of Arid Environments**. v.30, p.367-370, 1995.

LUCENA, D. T. Lista dos Protozoários Hemoparasitas de Aves da Região Neotrópica. **Rev. Fac. Med. Vet. S. Paulo**, v. 2, p. 1-34, 1941.

MAIA, J. P. M. C.; PERERA, A.; HARRIS, D. J. Molecular survey and microscopic examination of Hepatozoon Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina) in lacertid lizards from the western Mediterranean. **Folia Parasitol.** v.59, p.241–248, 2012.

MÁRQUEZ, C.; BECHARD, M.; GAST, F.; VANEGASET, V. H. **Aves Rapaces Diurnas de Colombia**. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Ramos López Editorial. 2005, 394 p.

MARTINEZ-ABRAÍN, A.; ESPARZA, B.; ORO, D. Lack of blood parasites in bird species: Does absence of blood parasite vectors explain it all?. **Ardeola**. v.51, p.225-232, 2004.

MARZAL, A.; de LOPE, F.; NAVARRO, C.; MØLLER, A. P. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. **Oecologia**. v.142, p.541–545, 2005.

MASELLO, J.F.; CHOCONI, G.; SEGHAL, R.N.M.; TELL, L. Quillfeldt P: Blood and intestinal parasites in wild Psittaciformes: a case study of Burrowing Parrots (*Cyanoliseus patagonus*). **Ornitología Neotropical**. v.17, p.515-529, 2006.

MAXWELL, M. H. Attempted induction of an avian eosinophilia using various agents. **Res Vet Sci**. v.29, p.293–7, 1980.

MCSHEA, W.J.; REESE, E.G.; SMALL, T.W.; WELDON, P.J. An experiment on the ability of free-ranging turkey vultures (*Cathartes aura*) to locate carrion by chemical cues. **Chemoecology**. v.10, p.49-50, 2000.

MENDOZA, M. L. Z.; ROGGENBUCK, M.; VARGAS, K. M.; HANSEN, L. H.; BRUNAK, S.; GILBERT, M. T. P.; SICHERITZ-PONTÉN, T. Protective role of the vulture facial skin and gut microbiomes aid adaptation to scavenging. **Acta Vet Scand**. v.60, p.61, 2018.

MERINO, S. Babesia bennetti n. sp. from the yellow-legged gull (*Larus cachinnans*, Aves, Laridae) on Benidorm Island, Mediterranean Sea. **Journal of Parasitology**, v.84, p.422–424, 1998.

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

MERINO, S.; BELLIORE, B. Ectoparasite effects on nestling European storm petrels. **Waterbirds**. v.22, p.297–301, 1999.

MERINO, S.; MARTINEZ, J.; MASELLO, J.F.; BEDOLIA, Y.; QUILLIFELDT, P. First Molecular Characterization of a Hepatozoon species (Apicomplexa: Hepatozoidae) Infecting Birds and Description of a New Species Infecting Storm Petrels (Aves: Hydrobatidae). **J. Parasitol.** v.100, p.338–343, 2014.

MERINO, S.; MINGUEZ, E. Absence of hematozoa in a breeding colony of the storm petrel *Hydrobates pelagicus*. **Ibis**. v.140, p.180–181, 1998.

MERINO, S.; MORENO, J.; SANZ, J. J.; ARRIERO, E. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). **Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences**. v.267, p. 2507–2510, 2000.

MICHEL, J. C. *Hepatozoon mauritanicum* (Et. et Ed. Sergent, 1904) n. comb., parasite de Testudo graeca: Redescription de la sporogonie chez *Hyalomma aegyptium* et la schizogonie tissulaire d'après le matériel d'E. Brumpt. **Annales de Parasitologie**. v.48, p.11-21, 1973.

MILLER, W. W. *Hepatozoon perniciosum* n. g., n. sp., a haemogregarine pathogenic for white rats; with a brief description of the sexual cycle in the intermediate host, a mite (*Laelaps echidninus* Berlese). **Bulletin of the Hygiene Laboratory of Washington**. v.46, p.51-123, 1908.

MITKOVA, B.; HRAZDILOVA, K.; NOVOTNA, M.; JURANKOVA, J.; HOFMANNOVA, L.; FOREJTEK, P.; MODRY, D. Autochthonous Babesia canis, Hepatozoon canis and imported Babesia gibsoni infection in dogs in the Czech Republic. **Vet. Med.** v.62, p.138–146, 2017.

MOENS, M. A. J.; PÉREZ-TRIS, J. Discovering potential sources of emerging pathogens: South America is a reservoir of generalist avian blood parasites. **International Journal for Parasitology**. v.46, p.41-49, 2016.

MOHAMMED, A. H. H.; MANSOUR, N. S. The haemogregarine complex (an analytical systematic review). **Bulletin of the Faculty of Science, Cairo University**. v.35, p.39-51, 1959.

MØLLER, A.P.; NIELSEN, J.T. Malaria and risk of predation: A comparative study of birds. **Ecology**. v.88, p.871-881, 2007.

MOSS, T. H.; NICOLL, J. A. R.; IRONSIDE, J. W. **Intra-Operative Diagnosis of CNS Tumors**. 1st ed. London. Arnold Oxford University Press Inc. New York. 1997. 193 p.

MUNDIM, A.V.; MUNDIM, M.J.S.; BARBOSA, F.C. Hepatozoonosis canina. **Veterinária Notícias**. v.8; p.141-151, 2002.

MURATA, T. K.; SHIMODA, M.; INOUE, K.; SHIRAMIZU, M.; KANOE, Y.; TAURA; NAKAMA, S. Seasonal periodical appearance of Hepatozoon canis gamont in the peripheral blood. **Journal of Veterinary and Medical Science**. v.55, p.877-879, 1993.

NETHERLANDS, E.C., COOK, C.A., DU PREEZ, L.H., et al. "Monophyly of the species of Hepatozoon parasitizing (African) anurans, with the description of three new species from hyperoliid frogs in South Africa", **Parasitology**, v. 145, n. 8, p. 1039–1050, 2017.

NETO, J. A.; TSCHÁ, E. R.; FILHO, M. X. P. Controle do perigo aviário causado por aves com adoção de medidas mitigadoras. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, n. 45, 2006, Fortaleza. Pôster apresentado no XLIV **Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural**. Fortaleza, 2006. 17 p.

NORDMEYER, S.C.; HENRY, G.; GUERRA, T.; RODRIQUEZ, D.; FORSTNER, M.R.J.; Hahn, D. Identification of blood parasites in individuals from six families of freshwater turtles. **Chelonian Conserv. Biol.** v.19, 85–94, 2020.

O'DWYER, L. H.; DA SILVA, R. J.; MADEIRA, N. G. Description of gamontogonic and sporogonic stages of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) from *Caudisoma durissa* terrifica (Serpentes, Viperidae). **Parasitol Res.** v.108, p.845–851, 2011.

OGDEN, N. H.; LINDSAY, L. R.; HANINCOVA, K.; BARKER, I. K.; BIGRAS-POULIN, M.; CHARRON, D. F.; HEAGY, A.; FRANCIS, C. M.; O'CALLAGHAN, C. J.; SCHWARTZ, I.; THOMPSON, R. A. Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.6, p.1780–1790, 2008.

ORTUÑO, A.; CASTELLA, J.; CRIADO-FORNELIO, A.; BULING, A.; Barba-Carretero, J.C. Molecular detection of a *Hepatozoon* species in stray cats from a feline colony in North-eastern Spain. **Vet. Journal.** v.177, p.134–135, 2008.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; WEIGL, S.; LATROFA, M.S.; Stanneck, D.; Decapariis, D.; Capelli, G.; Baneth, G. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. **Parasite Vector.** v.4, p.55, 2011.

PEIRCE M.A. A Checklist of the valid avian species of *Babesia* (Apicomplexa: Piroplasmorida), *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Hemosporida), and *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). **J. Nat. Hist.** v.39, p.3621–3632, 2005.

PEIRCE, M. A. The significance of avian haematozoa in conservation strategies: Disease and threatened birds. **ICBP Technical Publication**, v.10, p.69-76, 1989.

PEIRCE, M. A.; BROOKE, M. Failure to detect blood parasites in seabirds from the Pitcairn Islands. **Seabird.** v. 15, p.72–74, 1993.

PEIRCE, M.A.; JAKOB-HOFF, R.M.; TWENTYMAN, C. New species of haematozoa from Apterygidae in New Zealand. **J. Nat. Hist.** 2003, v.37, p.1797–1804, 2003.

PEIRCE, M.A.; PRINCE, P.A. *Hepatozoon albatrossi* sp. nov: (Eucoccida: Hepatozoidae) from Diomedea spp. in the Antarctic. **J. Nat. Hist.** v.14, p.447–452, 1980.

PESSÔA, S. B.; CAVALHEIRO, J. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras: IX. Sobre a hemogregarina da *Helicops carinicauda* (Wied.). **Revista Goiana de Medicina** v.15, p.161-168, 1969b.

PESSÔA, S. B.; CAVALHEIRO, J. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras: VIII. Sobre a evolução da *Haemogregarina miliaris* na sanguessuga *Haementeria lutzi*. **Revista Brasileira de Biologia.** v.29, p.451-458, 1969a.

PETERSEN, E. S., PETRY, M. V. & GARCIA, L. K. Utilização de diferentes habitats por aves de rapina no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 19, n. 3, p. 376-384, 2011.

PIERSMA, T. Do global patterns of habitat use and migration strategies co-evolve with relative investment in immunocompetence due to spetial variation in parasites presure?. **Oikos.** v.80, p.623-631, 1997.

PITARELLI, A.; PEREIRA, M. Dieta de aves na região leste do Mato Grosso do Sul. **Ararajuba.** v.10, p.131-139, 2002.

PLAZA, P.I.; BLANCO, G.; LAMBERTUCCI, S.A. Implications of bacterial, viral and mycotic microorganisms in vultures for wildlife conservation, ecosystem services and public health. **Ibis**. v.162, p.1109–1124, 2020.

PLIMMER, H. G. On the blood parasites found in animals in the zoological gardens during the four years 1908-1911. **Proceedings of the Zoological Society of London** v.1912, p.406-419, 1912.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina: Planta, 2001. 328p.

QUILLFELDT, P., ROMEIKE, T., MASELLO, J. F., REINER, G., WILLEMS, H., BEDOLLA-GUZMAN, Y. Molecular survey of coccidian infections of the side-blotched lizard *Uta stansburiana* on San Benito Oeste Island, Mexico. **Parasite**, v. 25, 2018.

QUILLFELDT, P.; ARRIERO, E.; MARTÍNEZ, J.; MASELLO, J. F.; MERINO, S. Prevalence of blood parasites in seabirds – a review. **Frontiers in Zoology**. v.8, p. 26, 2011.

QUILLFELDT, P.; MARTÍNEZ, J.; BUGONI, L.; MANCINI, P.L.; MERINO, S. Blood parasites in noddies and boobies from Brazilian offshore islands – differences between species and influence of nesting habitat. **Parasitology**. v.141, p.399–410, 2014.

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

RABENOLD, P. P. Family associations in communally roosting black vultures. **The Auk**, v.103, n. 1, p. 32-41. 1986.

RAE, M. Hemoprotozoa of caged and aviary birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**. v.4, p.131–137, 1995.

RAMOS, C.A.N.; BABO-TERRA, V.J.; PEDROSO, T.C.; FILHO, A.F.S.; ARAÚJO, F.R.; Cleveland, H.P.K. Molecular identification of *Hepatozoon canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.** v.24, p.247–250, 2015.

REICHENOW, E. Karyolysus lacerate, ein wirtwechselndes Coccidium der Eidechse *Laverta muralis* und der Milbe *Liponyssus saurorum*. **Arb. Gesundh. Amt. Berl.** v.45, p.317–363, 1913.

REMPLE, J. D. Intracellular Hematozoa of Raptors: A Review and Update. **Journal of Avian Medicine and Surgery**. v.18, p.75–88, 2004.

RIBEIRO, S. F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F. C. S.; MARINE, M. Â.; VAGO, A. R.; BRAGA, E. M. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. **Parasitology**, v. 130, p. 261-267, 2005.

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

ROBIN, L. A. Cycle évolutif d'un *Hepatozoon* de *Gecko verticillatus*. **Annales de l'Institut Pasteur**. v.56, p.376-394, 1936.

- ROGGENBUCK, M.; SCHNELL, I. B.; BLOM, N.; BÆLUM, J.; BERTELSEN, M. F.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; SØRENSEN, S. J.; GILBERT, M. T. P.; GRAVES, G. R.; HANSEN, L. H. The microbiome of New World vultures. **Nat. Commun.** v.5, p.5498, 2014.
- RUBINI, D.S.; PADUAN, K.S.; PEREZ, R.R.; RIBOLLA, P.E.M.; O'Dwyer, L.H. Molecular characterization of feline Hepatozoon species from Brazil. **Vet. Parasitol.** v.137, p.168–171, 2006.
- SAMBON, L. W.; SELIGMANN, G. The haemogregarines of snakes. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v.11, p.355-358, 1908.
- SAMOUR, J. Management of raptors. In: HARRISON, G.; LIGHTFOOD, T. (Eds). **Clinical Avian Medicine.** Palm Beach: Spix Publishing, 2006, p. 915-956.
- SANTOS, L. C.; CUBAS, P. H. Colheita e Conservação de Amostras Biológicas. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária.** São Paulo: Roca, 2014. p. 1690-1702.
- SCHEUERLEIN, A.; RICKLEFS, R.E. Prevalence of blood parasites in European passeriform birds. **Proceedings of the Royal Society of London Series B.** v.271, p.1363-1370, 2004.
- SCHMIDT, E. M. S. Patologia Clínica de Aves. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária.** São Paulo: Roca, 2014. p. 1715-1735.
- SECCHI, E.R.; DANILEWICZ, D.; OTT, P.H. Applying the phylogeographic concept to identify franciscana dolphin stocks: implications to meet management objectives. **Journal of Cetacean Research and Management.** v.5, p.61-8, 2003.
- SHIMIZU, T.; YASUDA, N.; KONO, I.; KOYAMA, T. Fatal infection of Hepatozoon-like organisms in the young captive cranes (*Grus monacha*). Mem. Fac. Agric. **Kagoshima Univ.** v.23, p.99–107, 1987.
- SHURULINKOV, P. Occurrence of haematozoan parasites of genus Hepatozoon (Apicomplexa: Hepatozoidae) in wild birds in Bulgaria. **Acta Zool. Bulg.** v.57, p.245–252, 2005.
- SHURULINKOV, P.; CHAKAROV, N. Prevalence of blood parasites in different local populations of reed warbler (*Acrocephalus scirpaceus*) and great reed warbler (*Acrocephalus arundinaceus*) **Parasitol. Res.** v.99, p.588–592, 2006.
- SICK, H. **Ornitologia Brasileira.** Rio de Janeiro, Ed. Nova Fronteira, 862 p. 1997.
- SIDDALL, M. E. Phylogeny of adeleid blood parasites with a partial systematic revision of the haemogregarine complex. **Journal of Eukaryotic Microbiology.** v.42, p.116-125, 1995.
- SIDDALL, M.E.; DESSER, S.S. Merogonic development of Haemogregarina balli (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in the leech Placobdella ornate (Glossiphoniidae), its transmission to a chelonian intermediate host and phylogenetic implications. **J. Parasitol.** v.77, p.426–436, 1991.

SIMONI, R. Proteína Total. In: VADEN, SHELLY L. et al. **Exames Laboratoriais e Procedimentos Diagnósticos em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2013. p. 489-491.

SLOBODA, M.; KAMLER, M.; BULANTOVA, J.; VOTÝPKA, J.; MODRY, D. A new species of Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleorina) from Python regius (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. **J. Parasitol.** v.93, p.1189–1198, 2007.

SMITH, T. G. The Genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **The Journal of Parasitology**, v.82, p. 565-585, 1996.

SMITH, T. G.; DESSER, S. S.; MARTIN, D. S. The development of *Hepatozoon sipedon* n. sp. (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in its natural host, the Northern water snake (*Nerodia sipedon sipedon*), the culicine vectors, *Culex pipiens* and *Culex territans*, and an intermediate host, the Northern leopard frog (*Rana pipiens*). **Parasitology Research**. v.80, p.559-568, 1994.

SOARES, E. S.; GUIMARÃES, I.G.; AMARAL, F.S.R.; FILHO, E.P.M.C.; GRANIZOLLI, M.A.; ALBUQUERQUE, J.L.B.; LISBOA, J.S.; AZEVEDO, M.A.G.; MORAES, W.; SANAIOTTI, T.M. **Plano de ação nacional para a conservação de aves de rapina. Coordenação-Geral de Espécies Ameaçadas**. Brasília: ICMBio – MMA. 2008. 136 p.

SORCI, G.; MØLLER, A.P. Comparative evidence for a positive correlation between haematozoan prevalence and mortality in waterfowl. **Journal of Evolutionary Biology**. v.10, p.731-741, 1997.

STABLER RM, HOLT PA. Hematozoa from Colorado birds. II. Falconiformes and Strigiformes. **J Parasitol.** v.51, p.927–928, 1965.

TELFORD, S. R. **The hemoparasites of the reptilian**. CRC Press, Boca Raton, 2009.

TELFORD, S. R., JR. Haemoparasites of reptiles. In: HOFF, G.L.; FRYE, F.L.; JACOBSON, E.R. **Diseases of amphibians and reptiles**. Plenum Press, New York, New York, 1984, p. 385-517.

TELFORD, S.R., JR.; ERNST, J.A.; CLARK, A.M.; BUTLER, J.F. Hepatozoon sauritus: A polytopic haemogregarine of three genera and four species of snakes in North Florida, with specific identity verified from genome analysis. **J. Parasitol.** v.90, p.352–358, 2004.

TELLA, J.L.; BLANCO, G.; FORERO, M.G.; GAJON, A.; DONAZAR, J.A.; HIRALDO, F. Habitat, world geographic range, and embryonic development of hosts explain the prevalence of avian hematozoa at small spatial and phylogenetic scales. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.96, p.1785-1789, 1999.

TELLA, J.L.; CORTAZAR, C.; GAJON, A.; OSACAR, J.J. Apparent lack of effects of a high louse-fly infestation (Diptera, Hippoboscidae) on adult colonial alpine swifts. **Ardea**. v.83, p.435-439, 1995.

THRALL, M. A. Classification of and diagnostic approach to anemian. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. 2. ed. Ames IO: John Wiley & Sons, 2012. p. 75-80.

TOMÉ, B.M.; MAIA, J.P.M.C.; HARRIS, D.J. Molecular assessment of apicomplexan parasites in the snake *Psammophis* from north Africa: Do multiple parasite lineages reflect the final vertebrate host diet? **J. Parasitol.** v.99, p.883–887, 2013.

TVEDTEN, H. Laboratory and clinical diagnosis of anemia. In: WEISS, D. J.; WARDDROP, K. J. **Scham's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2009. p.152-161.

VALERA, F.; CARRILLO, C.M.; BARBOSA, A.; MORENO, E. Low prevalence of haematozoa in Trumpeter finches *Bucanetes githagineus* from south-eastern Spain: additional support for a restricted distribution of blood parasites in arid lands. **Journal of Arid Environments**. v.55, p.209-213, 2003.

VALKIŪNAS, G. **Avian Malaria Parasites and other Haemosporidia**. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2005.

VALKIUNAS, G.; MOBLEY, K.; IEZHOVA, T.A. Hepatozoon *ellisgreineri* n. sp. (Hepatozoidae): Description of the first avian apicomplexan blood parasite inhabiting granulocytes. **Parasitol. Res.** v.115, p.609–613, 2016.

VALKIŪNAS, G.; SALAMAN, P.; IEZHOVA, T.A. Paucity of hematozoa in Columbian birds. **Journal of Wildlife Diseases**. v.39, p.445-448, 2003.

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

VAN-DEN-HEEVER, L.; THOMPSON, L.J.; BOWERMAN, W.W.; SMIT-ROBINSON, H.; SHAFFER, L.J.; HARRELL, R.M.; OTTINGER, M.A. Reviewing the role of vultures at the human–wildlife–livestock disease interface: An African perspective. **J. Raptor Res.** v. 55, n.3, p.311-327, 2021.

VANSTREELS, R. E. T.; PARSONS, N. J. Malária Aviária e outros Hemosporídeos Aviários. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2014. p. 1557- 1574.

VILCINS, I.E.; UJVARI, B.; OLD, J.M.; DEANE, E. Molecular and morphological description of a Hepatozoon species in reptiles and their ticks in the Northern Territory, Australia. **J. Parasitol.** v.95, p.434–442, 2009.

WAESCHENBACH, A.; WEBSTER, B.L.; BRAY, R.A.; LITTLEWOOD, D.T.J. Added resolution among ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with complete small and large subunit nuclear ribosomal RNA genes. **Mol. Phylogenet. Evol.** v.45, p.311–325, 2007.

WAHL, M. Blood-borne parasites in the Black Vulture *Coragyps atratus* in northwestern Costa Rica. **J. Vulture News**. v. 64, p. 1-10, 2013.

WALDENSTRÖM, J., BENSCH, S., HASSELQUIST, D., ÖSTMAN, Ö. A new nested PCR method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 191-194, 2004.

WANG, H.; MORAIS, R.: Nucleotide sequence of a B-actin cDNA from mitochondrial DNA-depleted chicken cells, 1992. GenBank, número de acesso: LO8165. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LO8165>>. Acesso em: 04 abril 2024.

WEBB, S. L.; FEDYNICH, A. M.; YELTATZIE, S. K. De VAULT, T. L.; RHODES JR, O. E. Survey of Blood Parasites in Black Vultures and Turkey Vultures from South Carolina. **Southeastern Naturalist**. v.4, p.355–360, 2005.

WENYON, C. M. **Protozoology: A manual for medical men, veterinarians and zoologists**. Baillibre, Tindall and Cassel Limited, London, U. K. 1926, 1563 p.

WOZNIAK, E. J.; TELFORD, J. S. R. The fate of *Hepatozoon* species naturally infecting Florida black racers and watersnakes in potential mosquito and soft tick vectors, and histological evidence of pathogenicity in unnatural host species. **International Journal for Parasitology**. v.21, p.511-516, 1991.

XAVIER, R.; SEVERINO, R.; PÉREZ-LOSADA, M.; GESTAL, C.; FREITAS, R.; HARRIS, D.J.; VERISSINO, A.; ROSADO, D.; CABLE, J. Phylogenetic analysis of apicomplexan parasites infecting commercially valuable species from the North-East Atlantic reveals high levels of diversity and insights into the evolution of the group. **Parasite Vector**. v.11, p.63, 2018.

YABSLEY, M. J.; VANSTREELS, R. E. T.; MARTINSEN, E. S.; WICKSON, A. G.; HOLLAND, A. E.; HERNANDEZ, S. M.; THOMPSON, A. T.; PERKINS, S. L.; WEST, C.J.; BRYAN, A. J.; CLEVELAND, C. A.; JOLLY, E.; BROWN, J. D.; MCRUER, D.; BEHMKE, S.; BEASLEY, J. C. Parasitaemia data and molecular characterization of *Haemoproteus catharticus* from New World vultures (Cathartidae) reveals a novel clade of Haemosporida. **Malaria Journal**, v. 17, n. 12, 10 p., 2018.

ZECHMEISTEROVÁ, K.; DE BELLOCQ, J.G.; ŠIROKÝ, P. Diversity of *Karyolysus* and *Schellackia* from the Iberian lizard *Lacerta schreiberi* with sequence data from engorged ticks. **Parasitology**. v.146, p.1690–1698, 2019.

ANEXO

A- Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47069-4	Data de Emissão: 17/07/2020 15:11:49	Data da Renovação: 01/06/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser renovada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cristiane Olivan Baldoni	CPF: 044.128.097-81
Título do Projeto: Detecção sorológica e caracterização molecular de agentes transmissíveis por artrópodos vetores em aves no Rio de Janeiro, Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 26.427.485/0001-05

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Processamento das amostras por meio de imunofluorescência indireta e PCR	07/2015	07/2017
2	Execução de PCR em tempo real, reações de clonagem, e sequenciamento e análise das sequências	01/2017	12/2017
3	Obtenção das amostras de aves e de vidalure (colheita de sangue e ectoparasitas)	01/2015	01/2018
4	Novas coletas e métodos de diagnóstico	06/2019	12/2020

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Marco Rogério André	Auxílio nas análises moleculares	302.435.145-50	Brasileira
2	TERNANDA MODESTO CARPINTERO	Coleta de material (sangue e ectoparasitas)	137.875.127-95	Brasileira
3	Andressa Guimarães	Auxílio nas análises moleculares	115.295.977-05	Brasileira
4	Natane Vidal Stocco	Coleta de amostras e análises laboratoriais	957.031.522-91	Brasileira
5	Agatha Ferreira Xavier de Oliveira	Coleta de amostras e análises laboratoriais	155.445.547-01	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o envio de estudo de emergência devido à COVID-19, sendo devolvido por ele de autoridade competente.
2	No caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular coleta e distribuição deverá contar a autorização de unidade e ter o COTAP/SEMAV ou COTAP das espécies, as condições para instalação das ações e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O fluxo de autorização ou de licença pertencente, assim como as instruções de solicitação, quando de visita de regulação, agente, ao quando de investigação, enviado ao Navegação de e informações referentes que submeterem a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 19/2010, ou que seja emitida pelo Autorizador, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou exportação. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou diásporas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoas físicas ou jurídicas estrangeiras, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coleta de dados, materiais, registros biológicos e científicos, sejam integrantes de cultura nativa e cultura popular, presente e passado, sob o patrocínio de instituições e pessoas que se beneficiem do estudo, é oferecido ao pesquisador a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O fluxo de licença ou autorização e os membros da equipe deverão obedecer aos métodos de coleta e instrumentais de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, estando a noite ou não, e/ou em áreas protegidas e outras áreas, e sempre sob o controle de coleta no campo que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições de vida.

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

Código de autenticação: 0470690420200717

Página 1/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47068-4	Data de Emissão: 17/07/2020 15:11:49	Data de Revalidação*: 01/06/2021
De acordo com o art. 25 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cristiane Duvan Baidari	CPF: 044.128.097-81
Título do Projeto: Detecção sorológica e caracterização molecular de agentes transmitidos por artrópodes vetores em aves no Rio de Janeiro, Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.485/0001-05

Observações e ressalvas

1	Esta autorização NÃO atende o pesquisador titular e de terceiros de sua equipe de pesquisa de coleta de amostras previstas em outras instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou locatário de área dentro das fronteiras de unidade de conservação federal cujo processo de regularização ambiental encontra-se em curso.
2	Este documento NÃO dispensa o cumprimento de legislação que dispõe sobre acesso e compartilhamento de patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja outras informações em www.mma.gov.br/gen .

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Cavema?	Tipo
1	Centro de Recuperação de Animais Silvestres	Rio de Janeiro-RJ	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atividades ex-situ (fora de refúgio)

Atividades X Taxões

#	Atividade	Taxão	Qtd.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Avesiformes	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Columbiformes	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Falconiformes	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Psittaciformes	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Psittaciformes	-
6	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Strigiformes	-
7	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Accipitriformes	-
8	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Cathartiformes	-

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

Código de autenticação: 0470690420200717

Página 2/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47068-4	Data de Emissão: 17/07/2020 15:11:49	Data de Revalidação*: 01/06/2021
De acordo com o art. 25 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular	
Nome: Cristiane Olyan Baldani	CPF: 044.128.097-81
Título do Projeto: Detecção sorológica e caracterização molecular de agentes transmitidos por artrópodes vetores em aves no Rio de Janeiro, Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 26.427.485/0001-05

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Aves)	Ectoparasitas, Sangue

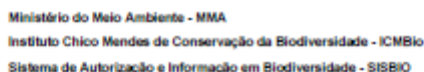
Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	Outro

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

Código de autenticação: 0470680420200717

Página 3/4



Número: 47068-4	Data da Emissão: 17/07/2020 15:11:49	Data da Revalidação*: 01/06/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		
Dados do titular		
Nome: Cristiane Duvan Baldani		CPF: 044.128.097-61
Título do Projeto: Detecção sorológica e caracterização molecular de agentes transmitidos por artrópodes vetores em aves no Rio de Janeiro, Brasil		
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO		CNPJ: 29.427.455/0001-05

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CNCB).

[illegible]

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Abreviás do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio de página do Siasb@CMEB no Internet (www.cmeb.org.br/siasb).

Código de autenticação: 0470690420200717

Página 4/4