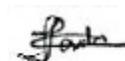


PROJETO DE PESQUISA

Avaliação sanitária em mamíferos aquáticos: detecção de infecções por coccídios, flagelados e microsporídios



Doutoranda

Thalita Faita

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Universidade de São Paulo



Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Universidade de São Paulo

São Paulo

2020

Título do projeto: Avaliação sanitária em mamíferos aquáticos: detecção de infecções por coccídios, flagelados e microsporídios

Resumo

Doenças infecciosas e parasitárias emergentes podem apresentar sérias implicações no *status* de conservação de espécies selvagens vulneráveis, sendo de amplo conhecimento que mamíferos aquáticos estão expostos a uma grande variedade de infecções. O Brasil apresenta grande diversidade de mamíferos aquáticos, incluindo a ocorrência de espécies ameaçadas de extinção. Contudo, há escassez de informações científicas sobre microrganismos patogênicos prevalentes nesses animais, os quais são considerados sentinelas do ecossistema aquático. Dentre os protozoários de relevância sanitária, destacam-se no filo Apicomplexa, os protozoários das famílias Sarcosystidae e Cryptosporidiidae, e, no filo Sarcomastigophora, as Giárdias. Mais além, destaca-se a ocorrência de patógenos provenientes do filo Microsporidia, incluso atualmente no reino Fungi, como causadores de doenças emergentes em animais aquáticos e com potencial impacto em comunidades ecológicas. Dessa forma, com a presente proposta objetiva-se a realização de triagem diagnóstica para investigação da ocorrência de microrganismos patogênicos em mamíferos aquáticos da Ordem Carnivora, subordem Pinnipedia; da Ordem Cetartiodactyla, subordem Odontoceti e Mysticeti; e da Ordem Sirenia, incluindo peixes-boi marinhos (*T. manatus manatus*) e peixes-boi amazônicos (*T. inunguis*), procedentes de cativeiro e de vida livre, oriundos de programas de manutenção, reabilitação e reintrodução na natureza na costa brasileira e na Região Norte do Brasil. Serão utilizadas amostras de fezes de animais vivos e mortos para identificação de *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e microsporídios, além de amostras de sangue de animais vivos para investigação de anticorpos anti – *Toxoplasma gondii*, e amostras de tecido de animais mortos para identificação de Sarcocistideos (*T. gondii* e gênero *Sarcocystis*). A obtenção de dados desta natureza é relevante para determinação da condição sanitária das populações desses animais de vida livre e de cativeiro nas regiões abordadas, colaborando assim com a conservação de espécies de mamíferos aquáticos no Brasil.

Palavras-chave: Cetáceos. Pinnipedia. Sirenia. Coccídios. Flagelados. Microsporídios.

Project title: Sanitary evaluation of aquatic mammals: detection of coccidia, flagellate and microsporidia infections

Abstract

Emerging infectious and parasitic diseases may have serious implications for the conservation status of vulnerable wild species, and it is well known that aquatic mammals are exposed to a wide variety of infections. Brazil has a great diversity of aquatic mammals, including the occurrence of endangered species. However, there is a shortage of scientific information regarding the prevalence of pathogenic microorganisms in these animals, which are considered sentinels of the aquatic ecosystem. Among the protozoa with sanitary relevance, the families Sarcocystidae and Cryptosporidiidae stand out in the phylum Apicomplexa, and, in the phylum Sarcomastigophora, the Giardia. In addition, pathogens from the phylum Microsporidia, which is currently classified in the Fungi kingdom, are prominent as cause of emerging diseases in aquatic animals, with potential impact on ecological communities. Therefore, the present proposal aims to perform diagnostic screening to investigate the occurrence of pathogenic microorganisms in aquatic mammals of the order Carnivora, suborder Pinnipedia; order Cetartiodactyla, suborder Odontoceti and Mysticeti; and of the Order Sirenia, including sirenians of the *T. inunguis* and *T. manatus manatus* species, from captivity and free-living animals, from maintenance, rehabilitation and reintroduction in nature programs, in the Brazilian coast and North region of Brazil. Feces samples from live and dead animals will be used for the identification of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and microsporidia, as well as blood samples from live animals to investigate anti - *Toxoplasma gondii* antibodies, and tissue samples from dead animals for identification of Sarcocystidae family protozoans (*T. gondii* and genus *Sarcocystis*). Data collection of this nature is relevant for determining the health status of the populations of these free-living and captive animals in the covered regions, collaborating with the conservation of aquatic mammals' species in Brazil.

Keywords: Cetacean. Pinnipedia. Sirenia. Coccidia. Flagellate. Microsporidia.

1. ENUNCIADO DO PROBLEMA

Os mamíferos aquáticos são animais placentários e que apresentam importante função ecológica, atuando como sentinela de águas oceânicas, costeiras e ribeirinhas, podendo indicar o estado sanitário do ambiente onde vivem. O Brasil apresenta grande diversidade de espécies de mamíferos aquáticos das Ordens Carnivora, Cetartiodactyla e Sirenia (Monteiro-Filho et al., 2013).

A Ordem Cetartiodactyla apresenta as subordens Odontoceti e Mysticeti. A subordem Odontoceti é caracterizada por espécies que apresentam homodontia e é composta por 10 famílias, 34 gêneros e 92 espécies, sendo que 47 espécies são de ocorrência relatada no Brasil. A subordem Mysticeti (quatro famílias, seis gêneros e 14 espécies) é composta pelas baleias, caracterizadas como animais de grande porte e que apresentam barbatanas, as quais são estruturas compostas por queratina e exercem importante papel de filtração e retenção de alimento. No Brasil já foi registrada a ocorrência de oito espécies desta subordem (ICMBio, 2019).

As espécies de cetáceos classificadas como ameaçadas de extinção que ocorrem no Brasil são: toninha (*Pontoporia blainvillei*), boto-cinza (*Sotalia guianensis*), baleia-franca-do-sul (*Eubalaena australis*), baleia-sei (*Balaenoptera borealis*), baleia-azul (*Balaenoptera musculus*), baleia-fin (*Balaenoptera physalus*), cachalote (*Physeter macrocephalus*) e boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) (ICMBio/MMA, 2018).

A Ordem Carnivora, subordem Pinippedia é composta por mamíferos aquáticos das famílias Odobenidae, Otariidae e Phocidae com espécies com o hábito de alimentação em mar aberto, e reprodução, descanso e muda da pelagem em terra ou gelo. No Brasil há registro da ocorrência de 7 espécies pertencentes às famílias Otariidae e Phocidae (Cubas e Silva e Catão-Dias, 2014).

A Ordem Sirenia é composta pelas famílias Dugongidae e Trichechidae, sendo que no Brasil há ocorrência de duas espécies da família Trichechidae: o peixe-boi-marinho (*T. manatus*) e o peixe-boi-amazônico (*T. inunguis*) (Deutsch et al., 2008). O peixe-boi amazônico é uma espécie fluvial distribuída em toda a bacia do rio Amazonas, principalmente em águas calmas e lagos. Ocorre no Peru, Equador, Colômbia e Brasil, além de registros ocasionais na divisa entre o Brasil e Guiana (Rosas, 1994; Marmontel et al., 2016). O peixe-boi marinho é uma espécie distribuída no Oceano Atlântico, do norte do Estado da Flórida, EUA, a cerca de 12° de latitude sul, México e América Central e norte da América do Sul, a nordeste do Brasil. No Brasil ocorre no litoral entre os estados de Alagoas e Amapá (Deutsch et al., 2008). O peixe-boi Amazônico e o peixe-boi marinho são considerados os mamíferos aquáticos mais ameaçados no Brasil (IBAMA, 2001), sendo ambas as espécies classificadas como Vulneráveis pela *IUCN Red List* (Deutsch et al., 2008; Marmontel et al., 2016) e constantes na Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção como em perigo de extinção (MMA, 2014).

Apesar de apresentar grande diversidade de espécies, os mamíferos aquáticos são considerados extremamente vulneráveis, principalmente devido à ameaças relacionadas à pressões antrópicas, tais como

redução e degradação de habitats, poluição ambiental, tráfego de embarcações, pressão de caça e captura incidental em redes de pesca (Deutsch et al., 2008; Marmontel et al., 2016). Além disso, já é de amplo conhecimento que os mamíferos aquáticos estão expostos a uma ampla variedade de infecções. Infecções por *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. (Gibson et al., 2011; Barbosa et al. 2015), *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. (Lasek-Nesselquist et al., 2008; Reboredo-Fernández et al., 2015) vêm sendo descritas em mamíferos marinhos de várias espécies em diversas localidades geográficas.

Entre os protozoários de relevância sanitária, podemos destacar, no filo Apicomplexa, os protozoários das famílias Sarcocystidae e Cryptosporidiidae, e, no filo Sarcomastigophora, as Giárdias. A família Sarcocystidae contempla parasitos formadores de cistos teciduais de importância em saúde pública e em saúde animal, dentre os quais podemos destacar o agente *Toxoplasma gondii*, bem como aqueles pertencentes ao gênero *Sarcocystis*, este último com quase 200 espécies (revisado em Dubey et al., 2015). Com ciclo intestinal restrito e causando quadros diarreicos, destacam-se os protozoários do gênero *Cryptosporidium* (família Cryptosporidiidae) e do gênero *Giardia* (filo Sarcomastigophora).

Protozoários da família Sarcocystidae tem onívoros e carnívoros como hospedeiros definitivos. Os hospedeiros definitivos eliminam com as fezes oocistos ou esporocistos infectantes para outros animais, que podem assim atuar como hospedeiros intermediários. Nos hospedeiros intermediários, os parasitos formam cistos teciduais maduros, especialmente na musculatura estriada e no sistema nervoso central, culminando, na maioria das vezes, em infecções crônicas e assintomáticas (Dubey et al., 1970). Contudo, a infecção nos hospedeiros intermediários pode ter um caráter agudo, antes da formação de cistos teciduais maduros. Na fase aguda pode haver replicação rápida dos parasitos em diversos sistemas, resultando em manifestações clínicas severas e diversas como encefalomielite, pneumonia e comprometimento hepático (Dubey et al., 2003; Gibson et al., 2011; Barbosa et al., 2015). Infecções agudas também podem ocorrer em decorrência da reativação dos cistos teciduais.

Infecções crônicas por *Sarcocystis* e *Toxoplasma* foram evidenciadas em diversas espécies de mamíferos aquáticos por meios de procedimentos moleculares direcionados à detecção de cistos teciduais e de procedimentos sorológicos para detecção de anticorpos séricos. Infecções agudas e infecções por ambos os grupos (*Sarcocystis* e *Toxoplasma gondii*) também já foram relatadas (Dubey et al., 2003; Gibson et al., 2011). Ademais, investigações direcionadas à pesquisa de parasitos em mamíferos aquáticos resultaram na identificação de infecções intestinais por protozoários coccídios entéricos ainda não descritos em leões marinhos da Califórnia, associadas, inclusive a infecções fatais (Colegrove et al., 2011), demonstrando que mamíferos aquáticos também podem atuar como hospedeiros definitivos de protozoários de relevância sanitária. Em *T. manatus*, já foram descritas infecções por *T. gondii* associada a meningoencefalite (Buergelt e Bonde, 1983), bem como infecção aguda por *T. gondii* em um espécime de peixe-boi das Antilhas encontrado

morto em Georgetown, Guiana, com detecção de taquizoítos em tecido cardíaco, associada a miocardite (Dubey et al., 2003). Smith et al. (2016) relataram infecção disseminada por *T. gondii*, com a presença de cistos cerebrais e taquizoítos em tecido hepático em *T. manatus latirostris*.

No Brasil, infecção por *T. gondii* foi descrita em *Sotalia guianensis*, associada a quadros de pneumonia intersticial, comprometimento adrenal e hepatite (Gonzalez-Vieira et al., 2013). Evidências sorológicas de infecção por *T. gondii* foram relatadas em peixes-boi amazônicos cativos (Mathews et al., 2012), em peixes-boi marinhos cativos (*T. manatus manatus*) (Attademo et al., 2016) e em boto da Amazônia de vida livre (*Inia geoffrensis*) (Santos et al., 2011), com frequências de ocorrência de 39,2%, 18% e 86,3%, respectivamente. Com exceção de três animais que apresentaram títulos de 3200 e um animal com título de 51200, dentre os peixes-boi marinhos testados, os demais relatos foram baseados em reações sorológicas com baixos títulos. Os dados sorológicos obtidos, foram baseados no uso do teste de soraglutinação modificada (Dubey e Desmont, 1987), cuja especificidade na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em mamíferos aquáticos vem sendo questionada, de maneira que o emprego de testes de ELISA ou de detecção molecular são indicados para a confirmação dos resultados positivos obtidos nos ensaios de aglutinação (Blanchet et al., 2014).

Os mecanismos de transmissão de Sarcocistídeos no ambiente marinho ainda não foram bem elucidados. A hipótese mais amplamente aceita é a de contaminação do ambiente aquático com oocistos eliminados pelos hospedeiros definitivos, os quais são ingeridos por animais marinhos (Fayer et al., 2004; Shapiro et al., 2012). Invertebrados marinhos filtradores, como mexilhões e ostras, podem adquirir oocistos, concentrando-os e podendo fazer parte da cadeia de transmissão quando ingeridos por determinadas espécies de mamíferos marinhos (Miller et al., 2008). A relevância das transmissões transplacentárias destes parasitos em mamíferos aquáticos não foi elucidada até o momento.

Parasitos pertencentes aos gêneros *Giardia* e *Cryptosporidium* apresentam ciclo intestinal restrito, com distribuição ubíqua e capazes de infectar uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo mamíferos, aves, anfíbios, peixes e répteis (Thompson, 2004; Appelbee et al., 2005). O ciclo de vida da *Giardia* compreende dois estágios: (i) o cisto inativo que é eliminado pelas fezes, podendo contaminar alimentos e fontes de água, sendo ingerido pelo hospedeiro suscetível; e (ii) o trofozoíto ativo, que se adere à mucosa intestinal do hospedeiro infectado, onde multiplica-se por fissão binária, causando principalmente diarreia e vômitos (Thompson e Monis, 2004). Em mamíferos, há três espécies de *Giardia* descritas. *Giardia muris* e *Giardia microti* são descritas apenas em roedores enquanto *G. intestinalis* é descrita em uma ampla variedade de espécies. *G. intestinalis* é classificada em oito agrupamentos genéticos ou *assemblages* (A a G). Apenas os *assemblages* A e B são considerados de transmissão interespecífica, tendo sido identificados em animais domésticos como cães, gatos, animais de produção e em algumas espécies silvestres. Os demais genótipos

parecem ter espectro mais estreito de hospedeiros (Thompson e Ash, 2016). Os agrupamentos de *G. intestinalis* só podem ser identificadas por métodos moleculares.

O gênero *Cryptosporidium* compreende 30 espécies descritas além de genótipos espécie-específicos de classificação incerta. A conceituação de espécie neste gênero é ainda um tema controverso, já que a maioria das identificações tem sido feita apenas em bases moleculares (Slapeta, 2013). Há uma forte relação entre genótipo do agente com o hospedeiro em que é encontrado, embora alguns destes genótipos possam ser encontrados em várias espécies de hospedeiros. Dentre tantas espécies, *C. pestis* (= *C. parvum*) parece ser a de maior amplitude de hospedeiros e maior extensão geográfica, sendo comumente associado a infecções em humanos e em animais de produção, mas também pode ser encontrado em espécies silvestres (Slapeta, 2013). As diferentes espécies e genótipos do gênero *Cryptosporidium* só podem ser identificadas por métodos moleculares (Slapeta, 2013; Thompson e Ash, 2016).

Cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* já foram encontrados em amostras de água doce e marinha, bem como em animais invertebrados marinhos como ostras e mexilhões (Graczyk et al., 2000; Fayer, 2004). Nos mamíferos aquáticos já foram relatadas infecções por *C. parvum* em golfinhos *Delphinus delphis* (Reboredo-Fernández et al., 2014), focas (Dixon et al., 2008) e leões marinhos (Deng et al., 2000). Dentre os sirênios, há relatos de infecção por *C. hominis*, espécie associada a infecções humanas, em dugongo (*D. dugon*) na costa da Austrália (Hill et al., 1997; Morgan et al., 2000). No Brasil, infecções por *Cryptosporidium* spp. foram descritas em *T. manatus manatus* e *T. inunguis* (Borges et al., 2011; Borges et al., 2017), por meio de métodos diretos de investigação laboratorial baseados na coloração de Kinyoun e no teste de imunofluorescência direta. Nos peixes-boi marinhos as infecções foram associadas a diarreia, desconforto abdominal e aumento do intervalo respiratório. Os protozoários relatados nestes estudos não foram caracterizados para identificação de espécie e variante genética, e a epidemiologia destas infecções ainda é desconhecida.

A presença de *Giardia* já foi descrita em fezes de aves, peixes e de mamíferos marinhos como focas, leões marinhos, baleias, golfinhos e toninhas de vida livre, encontrados encalhados (Olson et al., 1997; Fayer et al. 2004, Hughes-Hanks et al. 2005, Robertson 2007; Lasek-Nesselquist et al., 2008; Reboredo-Fernández et al., 2014), e em peixe-boi-marinho (*T. manatus manatus*) e peixe-boi-amazônico (*T. inunguis*) (Borges et al., 2017).

Atualmente, existe grande preocupação com a contaminação do ambiente aquático com cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* provenientes de dejetos humanos e de animais domésticos não tratados, os quais podem infectar mamíferos aquáticos, sendo que o impacto destas infecções não é bem conhecido atualmente. Estes animais podem ainda atuar como reservatórios destes parasitos no ambiente marinho (Fayer et al., 2004).

Os microsporídios pertencem ao filo Microsporidia, incluso no reino Fungi, e são caracterizados como parasitas eucariotos obrigatórios intracelulares que infectam uma grande variedade de hospedeiros, incluindo protozoários, artrópodes, peixes e mamíferos, com relatos de infecções em humanos, apresentando potencial zoonótico (Bigliardi e Sacchi, 2001; Didier et al., 2004).

Esses patógenos foram previamente classificados como protistas, principalmente por não possuírem organelas típicas de eucariotos, tais como mitocôndrias, peroxissomos e ribossomos 80S, e também por apresentarem ribossomos 70S, característico de procariotos (Keeling e McFadden, 1998). Porém evidências filogenéticas indicaram a classificação de microsporídios como fungos divergentes ao invés de protistas (Keeling et al., 2000; Vivarès et al., 2002; Tanabe et al., 2002; Fischer e Palmer, 2005; Gill e Fast, 2006; Gutiérrez-Capella et al., 2012).

São considerados parasitas oportunistas e foram descritas cerca de 1500 espécies em 187 gêneros (Vávra e Lukes, 2013). A taxonomia desses organismos é baseada primeiramente em seu ciclo e características ultra estruturais, incluindo o tamanho do desenvolvimento e organismos maduros, arranjo nuclear, número e tamanho das bobinas de filamento polar, localização intracelular de desenvolvimento, e modos de divisão nuclear e celular (Didier et al., 2004).

As espécies de microsporídios presentes em infecções humanas foram identificadas em fontes de água, bem como em animais domésticos, de produção e em selvagens, levantando a possibilidade de transmissão via aquática, alimentar e zoonótica (Anane e Attouchi, 2010). Também há relatos de transmissão via trauma ou contato direto, e em testes realizados em animais de laboratório relatou-se transmissão via inoculação intranasal, intra-retal, intracerebral, intratraqueal, intravenosa, intraperitoneal e transplacentária (Shaddock e Orestein, 1993; Snowden et al., 1998; Baneux e Pognan, 2003).

O estágio maduro e infeccioso dos microsporídios são os esporos em formato oval, relativamente resistentes ao ambiente (Didier et al., 2004; Weber et al., 1994). Apresentam um aparato de ejeção de esporos único, sendo que dentro de seu esporo há um filamento polar, caracterizado como organela distinta que everte para o exterior do esporo em períodos de infecção, e promove a penetração na membrana do hospedeiro. Subsequentemente, o conteúdo do esporo é descarregado dentro do citoplasma do hospedeiro por meio do filamento polar (Bigliardi e Sacchi, 2001; Keeling e Fast, 2002).

O sítio inicial ou primário de infecção depende do meio de transmissão, e tipicamente ocorre em células epiteliais do trato gastrointestinal ou respiratório. Segue com germinação e infecção das células hospedeiras, e então os microsporídios multiplicam-se durante merogonia e diferenciam-se em esporos durante esporogonia (Didier et al., 2000).

Em humanos os sinais de infecção mais comuns são diarreia persistente em pacientes considerados imuno-deficientes, ou diarreia auto-limitante em pacientes imuno-competentes (Didier et al., 2004). Porém

também são relatados outros sinais tais como bronquite, pneumonia, ceratoconjuntivite, uretite, nefrite, prostatite, peritonite, miosite, hepatite e encefalite (Weber et al., 1994; Franzen e Muller, 2001). Os esporos são excretados via fezes, aerossóis e urina, e permanecem no ambiente por um longo período de tempo (Li et al., 2003).

Para realização de exames diagnósticos podem ser utilizadas amostras de urina, fezes e soro, além de amostras de tecido. Como métodos diagnósticos podem ser utilizados microscopia de luz, microscopia eletrônica, citologia, histologia de rotina, imunofluorescência, cultura, exames sorológicos e moleculares (Garcia, 2002).

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) é caracterizada como um método altamente sensível e específico, sendo seguido por técnicas de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição que permitem a detecção de cepas e genótipos. Os métodos de PCR com subsequente genotipagem têm produzido resultados valorosos para estudos epidemiológicos como diferenciação ao nível de sub-espécies, que permite suposições acerca da especificidade de hospedeiros, origem, meios de transmissão e dinâmica de disseminação do patógeno (Weiss e Ghosh, 2009; Reddy et al, 2011; Tabatabaie et al, 2015).

Estimativas confiáveis da prevalência de infecções por microsporídios são difíceis de alcançar devido a variações na detecção do parasita, métodos de identificação, estudos de *designs* e das populações estudadas. Entre humanos, a microsporidose apresenta distribuição mundial, sendo relatada em países desenvolvidos e em desenvolvimento, em todos os continentes, com exceção da Antártida (Bryan e Schwartz, 1999).

Pesquisas recentes demonstraram o potencial para extrema plasticidade morfológica e habilidade de infectar todos os sistemas orgânicos e tecidos, sendo que no caso de animais esses patógenos são importantes não apenas para efeitos em nível individual, mas também apresentam a capacidade de ocasionar mudanças em populações e comunidades de hospedeiros (Stentiford et al., 2013).

Comparando-se às infecções em humanos e animais domésticos, pouco se sabe a respeito das microsporidioses em animais selvagens (Sulaiman et al., 2003; Hinney et al., 2016).

Animais selvagens infectados não só são considerados como uma possível ameaça para humanos e para outros animais, mas também apresentam uma problemática importante com relação à conservação da vida selvagem, uma vez que infecções por patógenos em animais não previamente expostos podem ser um grande risco para espécies ameaçadas de extinção, sendo que esse fato pode ocorrer em casos de introdução de hospedeiros infectados em seu habitat natural (Thompson, 2013). Além disso, relata-se casos de desenvolvimento da doença em animais selvagens de vida livre após terem sido colocados em cativeiro, podendo este fato estar relacionado ao estresse que resulta em imunossupressão (Dickens et al., 2009).

Em mamíferos aquáticos e semi-aquáticos há relatos de ocorrência de microsporídeo em um golfinho roaz (*Tursiops truncatus*) (Fayer et al., 2008), e em lontras e visons, com provável infecção via contaminação da água (Sulaiman et al., 2003).

No caso de animais marinhos, estudos indicaram que a habilidade de microsporídios permanecerem viáveis quando expostos a variação conservadora de salinidade e temperatura presentes na natureza é variável, porém em águas estuarinas de baixa salinidade o microsporídeo se manteve infeccioso por semanas, sendo suficiente para infectar humanos ou animais marinhos (Fayer, 2004).

A transmissão zoonótica através de animais selvagens pode ocorrer tanto pela presença desses animais, como pela contaminação ambiental com esporos presentes nas fezes e urina de animais de cativeiro e de vida livre, e principalmente pelo contato direto com animais em cativeiro (Hinney et al., 2016).

Tem-se urgência no entendimento do papel do Microsporidia em comunidades ecológicas e seu potencial em causar doenças emergentes em animais aquáticos e em humanos (Stentiford et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O presente projeto de pesquisa tem importante aplicação no contexto conservacionista de espécies de mamíferos aquáticos ameaçadas de extinção no Brasil, atendendo ao Plano de Ação Nacional para a Conservação de Mamíferos Aquáticos do ICMBio, que visa entre suas metas a ampliação do conhecimento científico sobre esses animais, incluindo a avaliação do estado de saúde de diversas espécies (Luna et al., 2011; Barreto et al., 2010).

Dada a escassez de informações científicas acerca de microrganismos patogênicos prevalentes em mamíferos aquáticos e à ocorrência de espécies ameaçadas de extinção no Brasil, nesta proposta definiu-se investigar infecções causadas por parasitos de importância sanitária que já foram evidenciadas em mamíferos aquáticos no Brasil, ou infecções que tenham sido consideradas relevantes em outras regiões no mundo.

O resultado da investigação dos patógenos elencados neste trabalho poderá fornecer subsídios para avaliar o potencial dos mesmos em causar enfermidade e mortalidade em mamíferos aquáticos em populações de vida livre e de cativeiro nas regiões abordadas, bem como para propor um protocolo diagnóstico que seja capaz de aferir de maneira eficiente o estado sanitário dos animais. Estes resultados podem ainda auxiliar no estabelecimento de um protocolo para monitoramento sanitário de populações selvagens e de cativeiro; Cabe ressaltar que protocolos bem definidos de diagnóstico são importantes em programas de conservação baseados na reabilitação, translocação e reintrodução de animais na natureza, com a finalidade de garantir a saúde dos indivíduos mantidos em cativeiro bem como de populações selvagens, uma vez que procedimentos desta natureza constituem fatores de risco importantes para a disseminação de enfermidades transmissíveis.

Mamíferos aquáticos são considerados animais sentinelas da qualidade ambiental (IBAMA, 2001), assim, a presente proposta pode ainda auxiliar na obtenção de informações sobre qualidade ambiental nos locais amostrados.

A obtenção de dados desta natureza é relevante para determinação da condição sanitária das populações desses animais de vida livre e de cativeiro nas regiões abordadas, colaborando assim com a conservação de espécies de mamíferos aquáticos no Brasil.

O objetivo desta proposta, portanto, é realizar uma triagem diagnóstica para investigar a ocorrência de microrganismos patogênicos em mamíferos aquáticos da Ordem Carnivora, subordem Pinnipedia; da Ordem Cetartiodactyla, subordem Odontoceti e Mysticeti; e da Ordem Sirenia, incluindo peixes-boi marinhos (*T. manatus*) e peixes-boi amazônicos (*T. inunguis*), procedentes de cativeiro e de vida livre, oriundos de programas de manutenção, reabilitação e reintrodução na natureza na costa brasileira e na Região Norte do Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Na presente proposta serão avaliados cetáceos, pinípedes e sirênios vivos, procedentes de vida livre e de cativeiro, bem como carcaças de animais encontrados mortos ou que vierem a óbito durante o desenvolvimento do projeto.

3.2. Colheita de amostras

3.2.1. Animais amostrados vivos de cativeiro ou de vida livre

Dos animais vivos, mantidos em cativeiro ou de vida livre, serão colhidas amostras de sangue e fezes. Amostras de sangue (10 ml por animal) serão obtidas do plexo branquial na fase interna realizando-se punção entre o rádio e a ulna sem a utilização de garrote, utilizando-se escalpe N°19G. Uma alíquota de volume de 6 ml será acondicionada em tubo a vácuo estéril contendo gel ativador de coágulo e a seguir submetida a centrifugação para obtenção de soro. Uma segunda alíquota de 4 ml será acondicionada em tubo a vácuo estéril contendo citrato de sódio como anticoagulante. Ambas as alíquotas serão mantidas a -20°C até a realização das provas diagnósticas.

Amostras de fezes serão obtidas diretamente da ampola retal, para diagnóstico molecular. Serão colhidas duas alíquotas. As amostras serão acondicionadas em frasco estéril e mantidas congeladas a -80° C para diagnóstico molecular.

3.2.2. Animais amostrados mortos de cativeiro ou de vida livre

No caso de animais que vierem a óbito ou que tenham sido encontrados mortos, será realizada a necropsia seguida da coleta de fragmentos de órgãos para a realização de análises moleculares para o diagnóstico de infecções parasitárias. Fragmentos dos seguintes órgãos serão coletados: cérebro, coração, pulmão, baço, timo, linfonodos, fígado, estômago, intestino, rins, músculo, língua, fragmentos de lesões cutâneas, útero, ovários, placenta, testículos, próstata.

De cada órgão, serão coletados dois fragmentos de aproximadamente 2 cm³, utilizando-se material estéril, dando-se preferência para fragmentos internos ou que apresentem lesões visíveis durante a necropsia. As amostras serão acondicionadas em sacos de plástico estéreis, vedado e identificado, sendo mantidas a -80°C até a realização dos exames moleculares.

3.3. Provas sorológicas

3.3.1. Diagnóstico de toxoplasmose

Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* serão detectados pelo teste de ELISA indireto para múltiplas espécies ID Screen® Toxoplasmosis Indirect Multiple-Species ELISA kit (IDvet Innovative Diagnostics), que é baseado na detecção de anticorpos utilizando-se proteína A/G conjugada com peroxidase (Schaefer et al., 2012).

3.4. Provas moleculares

As amostras de tecidos e sangue serão submetidas à extração de DNA empregando-se o *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen®, Hilden, Germany). Para a extração de DNA de amostras de fezes será utilizado o *QIAmp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen®, Hilden, Germany).

Os produtos de PCR serão detectados em eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) seguido de coloração com brometo de etídeo e visualização sob luz ultravioleta (Sambrook e Russel, 2001). Amostras positivas para PCR terão seus produtos amplificados cortados do gel de agarose com auxílio de lâmina de bisturi. Os fragmentos contendo as bandas serão acondicionados em microtubos para purificação, utilizando-se o *kit Illustra GFX PCR DNA e GEL Band Purification Kit* (GE Healthcare).

Os produtos de PCR purificados conforme descrito acima serão sequenciados de acordo com a prescrição do fabricante do *kit* Abi Prism Big Dye TM Terminator v 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing (Applied Biosystems, CA, USA) e sequenciadas em analisador automático Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer. Após editadas com auxílio do programa Codon Code Aligner, as sequências obtidas serão comparadas com sequências homólogas disponíveis no Genbank com análises filogenéticas, através do emprego do programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e MEGA7.

O delineamento proposto neste projeto é resumido na Figura 1.

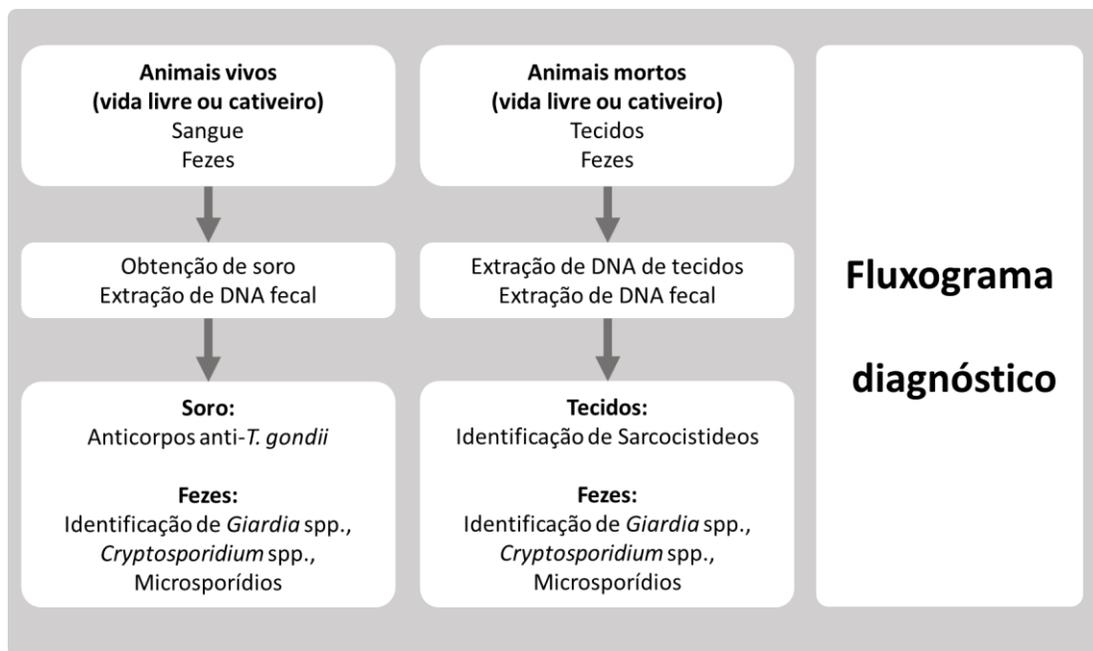


Figura 1: Fluxograma de procedimentos previstos para investigação de infecções por parasitos e por microsporídios em mamíferos aquáticos.

4. DISSEMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

A análise dos resultados será baseada no cálculo da frequência de ocorrência das infecções causadas pelos microrganismos pesquisados. Serão verificadas associações entre positividade para os patógenos pesquisados e a idade e sexo dos animais, empregando-se o teste de Qui-quadrado.

As provas moleculares empregadas acima são em sua maioria provas que permitem detectar ampla variedade de agentes dentro de um grupo ou nível taxonômico de patógenos. O sequenciamento dos fragmentos obtidos com cada PCR deverá fornecer informação precisa sobre qual o gênero ou espécie investigada.

Os resultados gerados serão divulgados em congressos científicos nacionais e internacionais e publicação dos resultados do projeto em periódicos científicas indexadas internacionais. Artigos de divulgação também poderão ser publicados, com vistas a informar a comunidade médico-veterinária e de biólogos que trabalham diretamente com as espécies de mamíferos aquáticos investigadas.

Quadro 1. Nomenclatura, sequência, região alvo, tipo de amostra biológica usada e referência bibliográfica dos *primers* utilizados para detecção de patógenos diretamente em amostras biológicas de sirênios brasileiros.

| Patógeno e região alvo dos primers | Primer | Sequência (5' → 3') | Amostras | Referência |
|--|---------|-----------------------------|---|----------------------|
| Microsporídio | AL4037 | GATGGTCATAGGGATGAAGAGCTT | Fezes | Sulaiman et al. 2003 |
| | AL4039 | AATACAGGATCACTTGGATCCGT | | |
| | AL4038* | AGGGATGAAGAGCTTCGGCTCTG | | |
| | AL4040* | AATATCCCTAATACAGGATCACT | | |
| Protozoários da família Sarcocystidae (região interespaçadora ITS1) | JS4 | CGAAATGGGAAGTTTTGTGAAC | Cérebro, língua, músculo, fígado, pulmão, coração, linfonodos, timo | Soares et al., 2011 |
| | CT2c | CTGCAATTCACATTGCGTTTCGC | | |
| | JS4b* | AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG | | |
| | CT2b* | TTGCGCGAGCCAAGACATC | | |
| Giardia (gene codificador da glutamato desidrogenase) | GDHeF | TCAACGYAAAYCGYGGYTTCCGT | Fezes | Read et al., 2004 |
| | GDHiF* | CAGTACAACCTCYGCTCTCGG | | |
| | GDHiR* | GTTRTCCTTGACATCTCC | | |
| Cryptosporidium (gene codificador da unidade 18S do RNA ribossomal) | SHP1 | ACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTAT | Fezes | Silva et al., 2013 |
| | SHP2 | TTTCATAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG | | |
| | SHP3* | ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACA | | |
| | SSU-R3* | AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA | | |
| | | | | |

* Primers utilizados em reações no formato de nested PCR ou semi-nested PCR

6. REFERÊNCIAS

- Amorim, D. B.; Casagrande, R. A.; Alievi, M. M.; Wouters, F.; De Oliveira, L. G.; Driemeier, D.; Tavares, M.; Ikuta, C. Y.; Telles, E. O.; Ferreira-Neto, J. S. *Mycobacterium pinnipedii* in a stranded South American sea lion (*Otaria byronia*) in Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 50, n. 2, p. 419-22, 2014.
- Anane, S.; Attouchi, H. Microsporidiosis: Epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*: v. 34, p. 450-464, 2010.
- Appelbee, A. J.; Thompson, R. C.; Olson, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife - current status and future needs. *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 8, p. 370-6, 2005.
- Attademo, F. L.; Ribeiro, V. O.; Soares, H. S.; Luna, F. O.; Sousa, G. P.; Freire, A. C.; Gennari, S. M.; Alves, L. C.; Marvulo, M. F.; Dubey, J. P.; Silva, J. C. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 47, n. 2, p. 423-6, 2016.
- Baily, J. L.; Méric, G.; Bayliss, S.; Foster, G.; Moss, S. E.; Watson, E.; Pascoe, B.; Mikhail, J.; Pizzi, R.; Goldstone, R. J.; Smith, D. G.; Willoughby, K.; Hall, A. J.; Sheppard, S. K.; Dagleish, M. P. Evidence of land-sea transfer of the zoonotic pathogen *Campylobacter* to a wildlife marine sentinel species. *Molecular Ecology*, v. 24, n. 1, p. 208-21, 2015.
- Baneux, P. J. R.; Pognan, F. In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Laboratory Animals*, v. 37, p. 132-138, 2003.
- Barbosa L.; Johnson, C. K.; Lambourn, D. M.; Gibson, A. K.; Haman, K. H.; Huggins, J. L.; Sweeny, A. R.; Sundar, N.; Raverty, S. A.; Grigg, M. E. A novel *Sarcocystis neurona* genotype XIII is associated with severe encephalitis in an unexpectedly broad range of marine mammals from the northeastern Pacific Ocean. *International Journal for Parasitology*, v. 45, n. 9-10, p. 595-603, 2015.
- Barnett, J. E.; Booth, P.; Brewer, J. I.; Chanter, J.; Cooper, T.; Crawshaw, T.; Davison, N. J.; Greenwood, A.; Riley, P.; Smith, N. H.; Wessels, M. *Mycobacterium bovis* infection in a grey seal pup (*Halichoerus grypus*). *Veterinary Record*, v. 173, n. 7, p. 173-168, 2013.
- Barreto, A.S; Campos, C.C.R.; Rosas, F.W.; Junior, J.M.S; Rosa, L.D.; Flores, P.A.C; Silva, V.M.F. Plano de Ação Nacional para a conservação dos mamíferos aquáticos: pequenos cetáceos. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. ICMBio,132 p, 2010.
- Bellehumeur, C.; Lair, S.; Romero, C. H.; Provost, C.; Nielsen, O.; Gagnon, C. A. Identification of a novel herpesvirus associated with a penile proliferative lesion in a beluga (*Delphinapterus leucas*). *Journal of Wildlife Diseases*, v. 51, n. 1, p. 244-9, 2015.
- Bigliardi, E.; Sacchi, L. Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infection*: n. 5, v. 3, p. 373-379, 2001.
- Blanchet, M. A.; Godfroid, J.; Breines, E. M.; Heide-Jorgensen, M. P.; Nielsen, N. H.; Hasselmeier, I.; Iversen, M.; Jensen, S. K.; Asbakk, K. West Greenland harbour porpoises assayed for antibodies against *Toxoplasma gondii*: false positives with the direct agglutination method. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 108, p. 181-186, 2014.
- Borges, J. C. G.; Lima, D. S.; Silva, E. M.; Moreira, A. L. O.; Marmontel, M.; Carvalho, V. L.; Amaral, R. S.; Lazzarini, S. M.; Alvez, L. C. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* sp. in aquatic mammals in northern and northeastern Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 126, n. 20, p. 25-31, 2017.
- Borges, J. C.; Alves, L. C.; Faustino, M. A.; Marmontel, M. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Antillean manatees (*Trichechus manatus*) and Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*) from Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 42, n. 4, p. 593-596, 2011.
- Bryan, R. T.; Schwartz, D. A. Epidemiology of microsporidiosis. In: Wittnes, M.; Weiss, K. *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, DC: ASM Press, p. 502-503, 1999.

- Buergelt, C. D.; Bonde, R. K. Toxoplasmic meningoencephalitis in a West Indian manatee. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 183, p. 1294-1296, 1983.
- Clayton, L.A.; Stamper, M. A.; Whitaker, B. R.; Hadfield, C. A.; Simons, B.; Makowski, J. L. *Mycobacterium abscessus* pneumonia in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 43, n. 4, p. 961-965, 2012.
- Colegrove, M. M.; Grigg, M. E.; Carlson-Bremer, D.; Miller, R. H.; Gulland, F. M.; Ferguson, D. J.; Rejmanek, D.; Barr, B. C.; Nordhausen, R.; Melli, A. C.; Conrad, P. A. Discovery of three novel coccidian parasites infecting California sea lions (*Zalophus californianus*), with evidence of sexual replication and interspecies pathogenicity. *Journal of Parasitology*, v. 97, n. 5, p. 868-77, 2011.
- Cubas, Z. S.; Silva, J. C. R.; Catão-Dias, J. L. *Tratado de Animais Selvagens*. 2ed. 2014.
- Davison, N. J.; Barnett, J. E. F.; Koylass, M.; Whatmore, A. M.; Perkins, M. W.; Deaville, R. C.; Jepson, P. D. *Helicobacter cetorum* infection in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*), Atlantic white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*), and beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) from the southwest coast of England. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 50, n. 3, p. 431-437, 2014.
- Delaney, M. A.; Colegrove, K. M.; Spraker, T. R.; Suerner, R. L.; Galloway, R. L.; Gulland, F. M. Isolation of *Leptospira* from a phocid: acute renal failure and mortality from *Leptospirosis* in rehabilitated northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*), California, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 50, n. 3, p. 621-7, 2014.
- Deng, M. Q.; Peterson, R. P.; Cliver, D. O. First findings of *Cryptosporidium* and *Giardia* in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Journal of Parasitology*, v. 86, n. 3, p. 490-494, 2000.
- Deutsch C. J.; Self-Sullivan, C.; Mignucci-Gioannoni, A. *Trichechus manatus*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T22103A9356917. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T22103A9356917.en>>, 2008; Acesso em 10 de junho de 2017.
- Dickens, M. J.; Earle, K. A.; Romero, L. M. Initial transference of wild birds to captivity alters stress physiology. *General and Comparative Endocrinology*, v. 160, n. 1, p. 76-83, 2009.
- Didier, E. S.; Didier, P. J.; Snowden, K. F.; Shaddock, J. A. Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection*: v. 2, p. 709-720, 2000.
- Didier, E. S.; Stovall, M. E.; Green, L. C.; Brindley, P. J.; Sestak, K.; Didier, P. J. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology*: n. 126, p. 145-166, 2004.
- Dixon, B. R.; Parrington, L. J.; Parenteau, M.; Leclair, D.; Santin, M.; Fayer, R. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in the intestinal contents of ringed seals (*Phoca hispida*) and bearded seals (*Erignathus barbatus*) in Nunavik, Quebec, Canada. *Journal of Parasitology*, v. 94, n. 5, p. 1161-3, 2008.
- Dubey J.P., Desmond G., 1987 Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Vet. J.*,19: 337-343.
- Dubey, J. P.; Miller, N. L.; Frenkel, J. K. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 157, n. 11, p. 1767-70, 1970.
- Dubey, J. P.; Zarnke, R.; Thomas, N. J.; Wong, S. K.; Van Bonn, W.; Briggs, M.; Davis, J. W.; Ewing, R.; Mense, M.; Kwok, O. C.; Romand, S.; Thulliez, P. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology*, v. 116, n. 4, p. 275-96, 2006.
- Dubey, J.P., Calero-Bernal, R., Rosenthal, B.M., Speer, C.A., Fayer, R., 2015. *Sarcocystosis of Animals and Humans*. CRC Press, Boca Raton, Fl. 481 p.
- Fayer, R. Infectivity of Microsporidia Spores Stored in Seawater at Environmental Temperatures. *Journal of Parasitology*, v. 90, n. 3, p. 654-657, 2004.
- Fayer, R.; Dubey, J. P.; Lindsay, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends in Parasitology*, v. 20, n. 11, p. 531-6, 2004.
- Fayer, R.; Fair, P. A.; Bossart, G. D.; Santín, M. Examination of Naturally Exposed Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) for Microsporidia, *Cryptosporidium*, and *Giardia*. *The Journal of Parasitology*, v. 94, n. 1, p. 143-147, 2008.

- Fischer, W. M.; Palmer, J. D. Evidence from small-subunit ribosomal RNA sequences for a fungal origin of Microsporidia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, n. 36, p. 606-622, 2005.
- Foster, G.; McAuliffe, L.; Dagleish, M. P.; Barley, J.; Howie, F.; Nicholas, R. A.; Ayling, R. D. *Mycoplasma* species isolated from harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) and a Sowerby's beaked whale (*Mesoplodon bidens*) stranded in Scottish waters. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 47, n. 1, p. 206-11, 2011.
- Franzen, C.; Muller, A. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes and Infection*: v. 3, p. 389-400, 2001.
- Garcia, L. S. Laboratory identification of the microsporidia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 1892-1901, 2002.
- Gibson, A. K.; Raverty, S.; Lambourn, D. M.; Huggins, J.; Magargal, S. L.; Grigg, M. E. Polyparasitism is associated with increased disease severity in *Toxoplasma gondii*-infected marine sentinel species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 5, p. 1142, 2011.
- Gill, E. E.; Fast, N. M. Assessing the microsporidia-fungi relationship: Combined phylogenetic analysis of eight genes. *Gene*: v. 375, p. 103-109, 2006.
- Goldman, C. G.; Matteo, M. J.; Loureiro, J. D.; Degrossi, J.; Teves, S.; Heredia, S. R.; Alvarez, K.; González, A. B.; Catalano, M.; Boccio, J.; Cremaschi, G.; Solnick, J. V.; Zubillaga, M. B. Detection of *Helicobacter* and *Campylobacter* spp. from the aquatic environment of marine mammals. *Veterinary Microbiology*, v. 133, n. 3, p. 287-91, 2009.
- Gonzales-Viera, O.; Marigo, J.; Ruoppolo, V.; Rosas, F. C.; Kanamura, C. T.; Takakura, C.; Fernández, A.; Catão-Dias, J. L. Toxoplasmosis in a Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*) from Paraná, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 191, n. 3-4, p. 358-62, 2013.
- Graczyk, T. K.; Conn, D. B.; Lucy, F.; Minchin, D.; Tamang, L.; Moura, L. N.; Da Silva, A. J. Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. *Parasitology Research*, v. 93, n. 5, p. 385-991, 2004.
- Gutiérrez-Capella, S.; Marcet-Houben, M.; Gabaldón, T. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biology*, n. 10, v. 10, 2012.
- Guzmán-Verri, C.; González-Barrientos, R.; Hernández-Mora, G.; Morales, J. A.; Baquero-Calvo, E.; Chaves-Olarte, E.; Moreno, E. *Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2012.
- Harper, C. G.; Feng, Y.; Xu, S.; Taylor, N. S.; Kinsel, M.; Dewhirst, F. E.; Paster, B. J.; Greenwell, M.; Levine, G.; Rogers, A.; Fox, J. G. *Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 12, p. 4536-4543, 2002.
- Hill, B. D.; Fraser, I. R.; Prior, H. C. *Cryptosporidium* infection in a dugong (*Dugong dugon*). *Australian Veterinary Journal*, v. 75, n. 9, p. :670-671, 1997.
- Hinney, B.; Sak, B.; Joachim, A.; Kv c, M. More than a rabbit's tale - Encephalitozoon spp. in wild mammals and birds. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 5, p. 76-87, 2016.
- Hughes-Hanks, J. M.; Rickard, L. G.; Panuska, C.; Saucier, J. R.; O'hara, T. M.; Dehn, L.; Rolland, M. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in five marine species. *Journal of Parasitology*, v. 91, n. 5, p. 1255-1228, 2005.
- IBAMA. Mamíferos Aquáticos do Brasil: Plano de A o. versão II, 2^a ed. Brasília: IBAMA, 102 p., 2001.
- ICMBio/MMA. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Amea ada de Extin o: Volume I. 1. ed. Brasília: 2018. 492 p.
- ICMBio. Guia Ilustrado de Identifica o de Cetáceos e Sir nios do Brasil. ICMBio/CMA. 2019.
- Keeling, P. J.; Fast, N. M. Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology*: n. 56, v. 1, p. 93-96, 2002.
- Keeling, P. J.; Luker, M. A.; Palmer, J. F. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within fungi. *Molecular Biology and Evolution*, n. 1, v. 17, p. 23-31, 2000.
- Keeling, P. J.; McFadden. Origins of microsporidia. *Trends in microbiology*, v. 6, n. 1, 1998.
- Lasek-Nesselquist, E.; Bogomolni, A. L.; Gast, R. J.; Welch, D. M.; Ellis, J. C.; Sogin, M. L.; Moore, M. J. Molecular characterization of *Giardia intestinalis* haplotypes in marine animals: variation and zoonotic potential. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 81, n. 1, p. 39-51, 2008.

- Li, X.; Palmer, R.; Trout, J. M.; Fayer, R. Infectivity of microsporidia spores stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology*, v. 89, p. 185-188, 2003.
- Loffler, S. G.; Rago, V.; Martínez, M.; Uhart, M.; Florin-Christensen, M.; Romero, G.; Brihuega, B. Isolation of a Seawater Tolerant *Leptospira* spp. from a Southern Right Whale (*Eubalaena australis*). *PLoS One*, v. 10, n. 12, 2015.
- Luna, F. O.; Da Silva, V. M. F.; Andrade, M. C. M.; Marques, C. C.; Normande, I. C.; Velôso, T. M. G.; Severo, M. M. Plano de Ação Nacional para a conservação dos sirênios: peixe-boi-da-amazônia: *Trichechus inunguis* e peixe-boi marinho: *Trichechus manatus*. Série Espécies Ameaçadas. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), 80 p., 2011.
- Marmontel, M.; de Souza, D.; Kendall, S. *Trichechus inunguis*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T22102A43793736. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T22102A43793736.en>>, 2016. Acesso em 10 de junho de 2017.
- Mathews, P. D.; da Silva, V. M.; Rosas, F. C.; D'affonseca Neto, J. A.; Lazzarini, S. M.; Ribeiro, D. C.; Dubey, J. P.; Vasconcellos, S. A.; Gennari, S. M. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. in manatees (*Trichechus inunguis*) of the Brazilian Amazon. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 43, n. 1, p. 85- 88, 2012.
- Mihindukulasuriya, K. A.; Wu, G.; St Leger, J.; Nordhausen, R. W.; Wang, D. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *Journal of Virology*, v. 82, n. 10, p. 5084-5088, 2008.
- Miller, M. A.; Miller, W. A.; Conrad, P. A.; James, E. R.; Melli, A. C.; Leutenegger, C. M.; Dabritz, H. A.; Packham, A. E.; Paradies, D.; Harris, M.; Ames, J.; Jessup, D. A.; Worcester, K.; Grigg, M. E. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *International Journal for Parasitology*, v. 38, n. 11, p. 1319-28, 2008.
- MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção- Anexo I - Portaria N° 444, de 17 de dezembro de 2014.
- Montalvo Villalba, M. C.; Cruz Martínez, D.; Ahmad, I.; Rodriguez Lay, L. A.; Bello Corredor, M.; Guevara March, C.; Martínez, L. S.; Martínez-Campo, L. S.; Jameel, S. Hepatitis E virus in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 123, n. 1, p. 13-18, 2017., 123:13-18.
- Morgan, U. M.; Xiao, L.; Hill, B. D.; O'Donoghue, P.; Limor, J.; Lal, A.; Thompson, R. C. Detection of the *Cryptosporidium parvum* "human" genotype in a dugong (*Dugong dugon*). *Journal of Parasitology*, v. 86, n. 6, p. 1352-1354, 2000.
- Nollens, H. H.; Rivera, R.; Palacios, G.; Wellehan, J. F.; Saliki, J. T.; Caseltine, S. L.; Smith, C. R.; Jensen, E. D.; Hui, J.; Lipkin, W. L.; Yochem, P. K.; Wells, R. S.; St Leger, J.; Venn-Watson, S. New recognition of *Enterovirus* infections in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Veterinary Microbiology*, v. 139, n. 1-2, p. 170-175, 2009.
- Olson, M. E.; Roach, P. D.; Stabler, M.; Chan, W. Giardiasis in ringed seals from the Western arctic. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 33, n. 3, p. 646-648, 1997.
- Read, C. M.; Monis, P. T.; Thompson, R. C. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 4, n. 2, p. 125-30, 2004.
- Reboredo-Fernández, A.; Ares-Mazás, E.; Martínez-Cedeira, J. A.; Romero-Suances, R.; Cacciò, S. M.; Gómez-Couso, H. *Giardia* and *Cryptosporidium* in cetaceans on the European Atlantic coast. *Parasitology Research*, v. 114, n. 2, p. 693-698, 2015.
- Reddy, A. K.; Balne, P. K.; Gaje, K.; Garg, P. PCR for the diagnosis and species identification of microsporidia in patients with keratitis. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 17, n. 3, 2011.
- Rehtanz, M.; Ghim, S. J.; Rector, A.; Van Ranst, M.; Fair, P. A.; Bossart, G. D.; Jenson, A. B. Isolation and characterization of the first American bottlenose dolphin papillomavirus: *Tursiops truncatus* papillomavirus type 2. *Journal of General Virology*, v. 87, n. 12, p. 3559-65, 2006.

- Robertson, L. J. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 120, n. 3, p. 201-16, 2007.
- Rosas, F. C. W. Biology, conservation and status of the Amazonian manatee *Trichechus inunguis*. *Mammal Review*, v. 24, p. 49-59, 1994.
- Rubio-Guerri, C.; García-Párraga, D.; Nieto-Peigrín, E.; Melero, M.; Álvaro, T.; Valls, M.; Crespo, J. L.; Sánchez-Vizcaíno, J. M. Adenovirus detected in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) suffering from self-limiting gastroenteritis. *BMC Veterinary Research*, v. 11, 2015.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ed, 999p., 2001.
- Santos, P. S.; Albuquerque, G. R.; da Silva, V. M.; Martin, A. R.; Marvulo, M. F.; Souza, S. L.; Ragozo, A. M.; Nascimento, C. C.; Gennari, S. M.; Dubey, J. P.; Silva, J. C. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-living Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*) from central Amazon, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 183, n. 1-2, p. 171-3, 2011.
- Schaefer, J. J.; White, H. A.; Schaaf, S. L.; Mohammed, H. O.; Wade, S. E. Chimeric protein A/G conjugate for detection of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G in multiple animal species. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 24, n. 3, p. 572-5, 2012.
- Shadduck, J. A.; Orenstein, J. M. Comparative pathology of microsporidiosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*: v. 117, p. 1215-1219, 1993.
- Shapiro, K.; Miller, M.; Mazet, J. Temporal association between land-based runoff events and California sea otter (*Enhydra lutris nereis*) protozoal mortalities. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 48, n. 2, p. 394-404, 2012.
- Silva, S. O.; Richtzenhain, L. J.; Barros, I. N.; Gomes, A. M.; Silva, A. V.; Kozerski, N. D.; de Araújo Ceranto, J. B.; Keid, L. B.; Soares, R. M. A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of *Cryptosporidium* spp. and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents. *Experimental Parasitology*, v. 135, n. 3, p. 551-7, 2013.
- Silva, S. O.; Richtzenhain, L. J.; Barros, I. N.; Gomes, A. M.; Silva, A. V.; Kozerski, N. D.; de Araújo Ceranto, J. B.; Keid, L. B.; Soares, R. M. A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of *Cryptosporidium* spp. and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents. *Experimental Parasitology*, v. 135, n. 3, p. 551-7, 2013.
- Slapeta, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? *International Journal for Parasitology*, v. 43, n. 12-13, p. 957-70, 2013.
- Smith, L. N.; Waltzek, T. B.; Rotstein, D. S.; Francis-Floyd, R.; Walsh, M. T.; Wellehan, J. F.; Gerhold, R.; Chapman, A. E.; de Wit, M. Disseminated toxoplasmosis *Toxoplasma gondii* in a wild Florida manatee *Trichechus manatus latirostris* and seroprevalence in two wild populations. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 122, n. 1, p. 77-83, 2016.
- Snowden, K. F.; Didier, E. S.; Oresnstein, J. M.; Shadduck, J. A. Animal Models of Human Microsporidial Infections. *Animal Science*, v. 48, p. 589-592, 1998.
- Soares, R. M.; Lopes, E. G.; Keid, L. B.; Sercundes, M. K.; Martins, J.; Richtzenhain, L. J. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a heminested-PCR (hnPCR-AP10) based on the H. heydorni RAPD fragment AP10. *Veterinary Parasitology*, v. 175, n. 1-2, p. 168-72, 2011.
- Stentiford, G. D.; Feist, S. W.; Stone, D. M.; Bateman, K. S.; Dunn, A. M. Microsporidia: diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems. *Trends Parasitology*, n. 29, v. 11, p. 567-78, 2013.
- Sulaiman, I. M.; Fayer, R.; Lal, A. A.; Trout, J. M.; Schaefer, F. Q.; Xiao, L. Molecular Characterization of Microsporidia Indicates that Wild Mammals Harbor Host-Adapted *Enterocytozoon* spp. as well as Human-Pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 8, p. 4495-4501, 2003.
- Tabatabaie, F.; Tafreshi, Z. A.; Shahmohammad, N.; Pirestani, M. Molecular detection of microsporidiosis in various samples of Iranian immunocompromised patients. *Journal of Parasitic Diseases*, v. 39, n. 4, p. 634-638, 2015.

- Tanabe, Y.; Watanabe, M. M.; Sugiyama, J. Are Microsporidia really related to Fungi?: A reappraisal based on additional gene sequences from basal fungi. *Mycological Research*: n. 106, v. 12, p. 1380-1391, 2002.
- Thompson, R. C. A. Parasite zoonoses and wildlife: one health, spillover and human activity. *International Journal for Parasitology*, v. 43, p. 1079-1088, 2013.
- Thompson, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary Parasitology*, v. 126, p. 15-34, 2004.
- Thompson, R. C. A.; Ash, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 40, p. 315-23, 2016.
- Thompson, R. C. A.; Monis, P. T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in Parasitology*, v. 58, p. 69-137, 2004.
- Van Bresseem, M. F.; Duignan, P. J.; Banyard, A.; Barbieri, M.; Colegrove, K. M.; de Guise, S.; Di Guardo, G.; Dobson, A.; Domingo, M.; Fauquier, D.; Fernández, A.; Goldstein, T.; Grenfell, B.; Groch, K. R.; Gulland, F.; Jensen, B. A.; Jepson, P. D.; Hall, A.; Kuiken, T.; Mazzariol, S.; Morris, S. E.; Nielsen, O.; Raga, J. A.; Rowles, T. K.; Saliki, J.; Sierra, E.; Stephens, N.; Stone, B.; Tomo, I.; Wang, J.; Waltzek, T.; Wellehan, J. F. Cetacean Morbillivirus: Current Knowledge and Future Directions. *Viruses*, v. 6, p. 5145-5181, 2014.
- Van Bresseem, M. F.; Simões-Lopes, P. C.; Féliz, F.; Kiszka, J. J.; Daura-Jorge, F. G.; Avila, I. C.; Secchi, E. R.; Flach, L.; Fruet, P. F.; du Toit, K.; Ott, P. H.; Elwen, S.; Di Giacomo, A. B.; Wagner, J.; Banks, A.; Van Waerebeek, K. Epidemiology of lobomycosis-like disease in bottlenose dolphins *Tursiops* spp. from South America and Southern Africa. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 117, n. 1, p. 59-75, 2015.
- Vávra, J.; Lukes, J. Microsporidia and “the art of living together”. *Advances in Parasitology*, n. 82, p. 254-319, 2013.
- Vivarès, C. P.; Gouy, M.; Thomarat, F.; Méténier, G. Functional and evolutionary analysis of a eukaryotic parasitic genome. *Current Opinion in Microbiology*, n. 5, v. 5, p. 499-505, 2002.
- Weber, R.; Bryan, R. T.; Schwartz, D. A.; Owen, R. L. Human microsporidial infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 7, p. 426-61, 1994.
- Weiss, L. M.; Ghosh, K. Molecular Diagnostic Tests for Microsporidia. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 9, 2009.
- Woo, P. C. Y.; Lau, S. K. P.; Lam, C. S. F.; Tsang, A. K. L.; Hui, S. W. H.; Fan, R. Y. Y.; Martelli, P.; Yuen, K. Y. Discovery of a novel bottlenose dolphin coronavirus reveals a distinct species of marine mammal coronavirus in Gammacoronavirus. *Journal of Virology*, v. 88, p. 1318-1331, 2014.