



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

***Cryptosporidium* spp. (Tyzzer, 1907), *Giardia* sp. (Leeuwenhoek, 1681) e
identificação de endoparasitos em mamíferos aquáticos no Brasil.**

JOÃO CARLOS GOMES BORGES

RECIFE-PE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

***Cryptosporidium* spp. (Tyzzer, 1907), *Giardia* sp. (Leeuwenhoek, 1681) e
identificação de endoparasitos em mamíferos aquáticos no Brasil.**

JOÃO CARLOS GOMES BORGES

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE-PE

2016

Ficha catalográfica

B732c Borges, João Carlos Gomes
Cryptosporidium spp. (Tyzzer, 1907), *Giardia* sp.
(Leeuwenhoek, 1681) e identificação de endoparasitos
em mamíferos aquáticos no Brasil / João Carlos Gomes
Borges.
– Recife, 2016.
104 f.: il.

Orientador(a): Leucio Câmara Alves.
Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2016.
Referências.

1. Parasitologia 2. Protozoários 3. Recursos hídricos
4. Diagnóstico I. Alves, Leucio Câmara, orientador II.

Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

***Cryptosporidium* spp. (Tyzzer, 1907), *Giardia* sp. (Leeuwenhoek, 1681) e
identificação de endoparasitos em mamíferos aquáticos no Brasil.**

Tese de Doutorado elaborada por:

JOÃO CARLOS GOMES BORGES

Aprovada em:...../...../.....

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

Orientador – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Profa. Dra. Maria Aparecida da Gloria Faustino
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dr. Vitor Luz Carvalho
Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos

Aos meus pais, Quintino e Silaine, por tudo o que sempre fizeram por mim e a batalha em proporcionarem as melhores condições para a minha formação acadêmica; minhas irmãs por todo amor e carinho; aos meus sobrinhos por desprenderem alegria e sorrisos em todos os nossos encontros.

Na lembrança de quem por inúmeras vezes contribuiu com a minha formação acadêmica, auxiliando com as “tarefas escolares” e sempre incentivando a busca dos meus objetivos profissionais, dedico este trabalho à eterna lembrança da minha querida e amada avó, JOANA GARCIA (“*in memoriam*”).

AGRADECIMENTOS

- A DEUS, por tudo o que vem proporcionando em minha vida, sobretudo na condução dos caminhos que tenho escolhido;
- A LÍlian Pantoja, que com toda a sua inteligência por diversas vezes ajudou-me a encontrar os caminhos, em momentos de dificuldades ao longo da tese, não medindo esforços para abdicar de diversas coisas em detrimento de estar ao meu lado. Serei eternamente grato por sua compreensão e carinho;
- Ao professor e orientador, Leucio Câmara Alves, que oportunizou uma nova etapa neste ciclo do doutorado, sempre motivado em contribuir com os seus brilhantes conhecimentos científicos, assim como as suas considerações para o meu desenvolvimento pessoal;
- À Fundação Mamíferos Aquáticos, por uma oportunidade única, a qual possibilitou todas as condições para a realização deste doutorado, seja buscando alternativas para suprir as minhas ausências e posteriormente o afastamento, como também proporcionando parte do suporte logístico requerido para a execução das atividades;
- A Jociery E. Vergara-Parente, certamente uma das maiores e mais admiráveis profissionais que conheço, sempre incentivando este doutorado e evidenciando a lembrança sobre a prioridade que deveria ter com este. É sempre motivo de orgulho poder contar acima de tudo com a sua amizade e atenção;
- A grande amiga Danielle Lima, uma das pessoas que mais contribuiu com este trabalho, sempre buscando condições para a realização das coletas e envio de amostras. Sem esta colaboração certamente o mérito desta pesquisa não seria o mesmo;
- A Profa. Dra. Maria Aparecida da Glória Faustino, que com a sua serenidade, sempre que precisei esteve disposta a ajudar-me;
- A todos os que fazem a Fundação Mamíferos Aquáticos, seja pela contribuição com a coleta de amostras biológicas ou suporte logístico para a realização das atividades. Foi extremamente importante poder contar com a colaboração de vocês;
- Ao Projeto Viva o Peixe-Boi Marinho e o patrocínio que foi concedido pela Petrobras, através do Programa Petrobras Socioambiental. Por meio deste, uma grandiosa colaboração foi aportada, considerando os profissionais que colaboraram com as atividades, aquisição de produtos laboratoriais e equipamentos;
- Ao Vitor Luz Carvalho, Ana Carolina O. Meirelles e a Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (AQUASIS), que desde o primeiro contato sempre

estiveram dispostos a colaborar com estas atividades. Ao projeto Manati, patrocinado pela Petrobras, em face a contribuição para a coleta de amostras fecais;

- A Miriam Marmontel, sempre apoiando e incentivando as ações voltadas para a pesquisa e conservação dos peixes-bois;
- A Beatriz Calena, que “abraçou” o compromisso com este projeto e em campo, mesmo diante a tantas adversidades e muitas horas de esforço, manteve a paciência e olho treinado para identificar e coletar “as amostras do João”;
- Ao Rodrigo Amaral e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, assim como a Stella Maris Lazzarini, Daniella Ribeiro e ao Centro de Preservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos (CPPMA) por toda a disponibilidade em contribuir com as atividades deste projeto;
- A Nathali Ristau e ao Instituto AMARES, por ter proporcionado a colaboração com as amostras biológicas no estado do Maranhão;
- Ao Dr. Sergio Moratto e a STCP Engenharia de Projetos Ltda por proporcionar as condições necessárias para o desenvolvimento das atividades no estado do Pará. A Mineração Rio do Norte (MRN) pelo apoio ao desenvolvimento de estudos na Flona de Saracá-Taquera e ao ICMBio-Trombetas e IBAMA pela emissão das licenças de pesquisa na Unidade;
- Ao PRMEA que por meio da equipe envolvida e suporte logístico proporcionou condições para a coleta de diversas amostras biológicas utilizadas neste estudo. A realização do Programa Regional de Monitoramento de Encalhes e Anormalidades é uma medida de avaliação de impactos ambientais exigida pelo licenciamento ambiental federal, conduzido pelo IBAMA;
- A Biorex Consultoria Ambiental mediante a sua parceira no desenvolvimento das atividades no estado do Amapá;
- A Sete Soluções e Tecnologia Ambiental por viabilizar a execução das atividades no estado de Rondônia;
- Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias, em especial ao Edson, Vitor, Gláucia e Neurisvan, que não mediram esforços em colaborar;
- A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado;
- Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical e especialmente a Universidade Federal Rural de Pernambuco, que proporcionaram mais esta conquista acadêmica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Área marítima e bacias da região Amazônica do Brasil	15
2.2 Mamíferos aquáticos	15
2.3 Fatores de risco à conservação dos mamíferos aquáticos	16
2.4 Parasitos em mamíferos aquáticos	17
2.4.1 Ciclo Evolutivo	18
2.4.2 Sinais clínicos e manifestações patológicas	20
2.4.3 Diagnóstico	21
2.4.4 Implicações para a Saúde Pública	22
2.5 Mamíferos aquáticos como sentinelas da qualidade dos recursos marinhos e fluviais	23
2.6 Referências	24
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4. Capítulo I – <i>Pulmonicola cochleotrema</i> (Digenea: Opisthotrematidae) in Antillean manatees (<i>Trichechus manatus manatus</i>) from the Northeastern region of Brazil	38
Abstract	39
Introduction	39
Material and Methods	40
Results	41
Discussion	42
Acknowledgements	44
References	44
5. Capítulo II – Treatment of <i>Pulmonicola cochleotrema</i> infection with ivermectin-praziquantel combination in Antillean manatees (<i>Trichechus manatus manatus</i>)	49
Abstract	50
Literature Cited	53

6. Capítulo III – <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> sp. em lontra neotropical (<i>Lontra longicaudis</i>) e ariranha (<i>Pteronura brasiliensis</i>) na região Norte do Brasil	55
Resumo	56
Abstract	56
Introdução	57
Material e Métodos	58
Resultados	60
Discussão	61
Agradecimentos	63
Referências	63
7. Capítulo IV – Infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> sp. em mamíferos aquáticos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil	66
Resumo	67
Abstract	67
Introdução	68
Material e Métodos	69
Resultados	72
Discussão	73
Agradecimentos	75
Referências	76
8. Capítulo V – Avaliação das técnicas parasitológicas e sorológicas no diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> sp. em mamíferos aquáticos	81
Resumo	82
Abstract	83
Introdução	83
Material e Métodos	84
Resultados	85
Discussão	87
Referências	88
9. Capítulo VI – Utilização da técnica de FLOTAC como um novo método de diagnóstico coproparasitológico em mamíferos aquáticos e a sua comparação com os métodos tradicionais	91
Resumo	92

Abstract	92
Introdução	93
Material e Métodos	94
Resultados	95
Discussão	98
Referências Bibliográficas	99
10. CONCLUSÕES GERAIS	104

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figure 1: <i>Pulmonicola cochleotrema</i> (Digenea: Opisthotrematidae) found in the nostril of Antillean manatee	41
--	----

Capítulo 2

Figure 1: Presence of nasal mucous secretion in an Antillean manatee	51
--	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

Tabela 1: Procedência das amostras fecais provenientes das lontras e ariranhas	59
Tabela 2: Frequência absoluta (FA) e relativa (FR) de infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Giardia</i> spp. e co-infecção em lontras e ariranhas, utilizando as técnicas de Kinyoun, centrífugo-flutuação e imunofluorescência direta.	60

Capítulo 4

Tabela 1. Procedência das amostras fecais provenientes das 15 espécies de mamíferos aquáticos.	71
--	----

Capítulo 5

Tabela 1. Avaliação das técnicas laboratoriais utilizadas para o diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> sp. em mamíferos aquáticos	86
---	----

Capítulo 6

Tabela 1. Procedência das amostras fecais provenientes das 12 espécies de mamíferos aquáticos.	95
Tabela 2. Infecção simples e co-infecção por parasitos gastrointestinais em mamíferos aquáticos	96
Tabela 3. Avaliação das técnicas de Willis, Hoffman, Faust and FLOTAC no diagnóstico dos parasitos gastrointestinais de mamíferos aquáticos.	97

RESUMO

Abrigando cinco importantes biomas e o maior sistema fluvial do mundo, o Brasil tem a mais rica biota continental do planeta, o que rendeu o título de país megadiverso. Dentro deste contexto, encontram-se várias espécies de mamíferos aquáticos, as quais vem sofrendo constantemente com os efeitos antropogênicos e por vezes desencadeantes de diversos agentes parasitários. Entretanto, o conhecimento científico da fauna parasitária dos mamíferos aquáticos ainda é bastante limitado. Desta forma, este trabalho teve por objetivo diagnosticar infecções ocasionadas por *Cryptosporidium* spp., *Giardia* sp. e endoparasitos em mamíferos aquáticos no Brasil. Para isto foram realizadas coletas de 553 amostras de conteúdo fecal e do trato gastrointestinal de diversas espécies de cetáceos, sirênios (peixe-boi marinho e amazônico) e mustelídeos (lontra neotropical e ariranha), nas regiões Norte (Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia) e Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte). Entre os animais envolvidos foi possível obter amostras de espécimes mantidos em cativeiro e de vida livre, bem como, de espécies que habitavam os recursos fluviais, costeiros e oceânicos. Para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. as amostras fecais foram processadas pela técnica de Kinyoun. Ao que concerne à identificação dos cistos de *Giardia* sp. e ovos de helmintos, o material coletado foi submetido aos métodos de flutuação (Willis e Faust) e sedimentação (Hoffman), assim como à técnica do Flotac. Todas as amostras foram submetidas ao Teste de Imunofluorescência Direta. Entre os resultados obtidos destaca-se a infecção ocasionada pelo trematódeo digenético da família Opisthorematidae, espécie *Pulmonicola cochleotrema*, sendo a frequência da infecção de aproximadamente 7,95% (07/88) em peixes-bois marinhos. A presença de *Cryptosporidium* spp. foi constatada em cinco espécies, sendo estas, a *Lontra longicaudis* (15,28%), *Pteronura brasiliensis* (41,66%), *Sotalia guianensis* (9,67%), *Trichechus inunguis* (16,03%) e *Trichechus manatus* (13,79%). No que concerne à ocorrência de *Giardia* sp., este coccídio foi diagnosticado em um maior número de espécies, conforme pode ser constatado em *L. longicaudis* (9,23%), *P. brasiliensis* (29,16%), *Kogia breviceps* (100%), *Kogia sima* (25%), *S. guianensis* (9,67%), *T. inunguis* (3,81%) e *T. manatus* (10,34%). A identificação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. acometendo os mamíferos aquáticos, aliado à capacidade dos oocistos e cistos respectivamente destes protozoários permanecerem infectantes em condições ambientais por um longo período de tempo, amplia a possibilidade de transmissão destes agentes para outros organismos aquáticos, terrestres e populações humanas.

Palavras-chave: Parasitologia, protozoários, conservação, recursos hídricos, diagnóstico.

ABSTRACT

With five significant biomes and the largest river system in the World, Brazil has the richest continental biota on the planet, which has led to the country being classified as megadiverse. In Brazil, several species of aquatic mammals have been suffering almost constantly from the anthropogenic, and sometimes triggering, effects of different parasitic agents. However, our scientific knowledge of the parasitic fauna of aquatic mammals remains limited. Thus, the aim of the present study was to diagnose infections caused by *Cryptosporidium* spp., *Giardia* sp. and endoparasites among aquatic mammals in Brazil. To do this, 553 samples were collected from fecal content and the gastrointestinal tract of several species of cetaceans, sirenians (Antillean and Amazonian manatees) and mustelids (neotropical and giant otters) in the North (Amapá, Amazonas, Pará and Rondônia) and Northeast (Alagoas, Bahia, Ceará, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte) of Brazil. Samples were obtained from animals that were kept in captivity and others in the wild, including specimens that lived in rivers, coastlines and oceans. For *Cryptosporidium* spp., the fecal samples were processed by Kinyoun technique. Concerning the identification of *Giardia* sp. cysts and helminth eggs, the material collected was submitted to flotation (Willis and Faust) and sedimentation (Hoffman) methods, followed by the Flotac technique. All samples were subjected to the direct immunofluorescence test. In the results obtained, a notable infection was caused by the digenetic trematode of the Opisthorematidae family (*Pulmonicola cochleotrema*), with an infection prevalence of approximately 7.95% (07/88) among Antillean manatees. The presence of *Cryptosporidium* spp. was confirmed in five species: *Lontra longicaudis* (15.28%); *Pteronura brasiliensis* (41.66%); *Sotalia guianensis* (9.67%); *Trichechus inunguis* (16.03%) and *Trichechus manatus* (13.79%). *Giardia* sp. was diagnosed in the following species: *L. longicaudis* (9.23%); *P. brasiliensis* (29.16%); *Kogia breviceps* (100%); *Kogia sima* (25%); *S. guianensis* (9.67%); *T. inunguis* (3.81%) and *T. manatus* (10.34%). The identification of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* sp. in aquatic mammals, allied to the capacity of their oocysts and cysts, respectively, to remain infective in the environment for a long period of time, increases the possibility of the transmission of these agents to other aquatic and land organisms, as well as the human population.

Keywords: Parasitology; protozoa; conservation; water resources; diagnosis

1. INTRODUÇÃO

Nos ecossistemas marinhos e de água doce presentes nos limites territoriais do Brasil são reportadas aproximadamente 59 espécies de mamíferos aquáticos (ROCHA-CAMPOS et al., 2010; ANDRADE et al., 2011; ROCHA-CAMPOS e GUSMÃO-CÂMARA, 2011), as quais estão submetidos a diversos fatores de origem antropogênica (TORRES et al., 2015). Soma-se a estes, as transformações que os ambientes aquáticos vêm sofrendo, estabelecendo com isto, novas relações entre diversas espécies de parasitos e os seus hospedeiros (BONDE et al., 2004; SICILIANO et al., 2005; VAN BRESSEM et al., 2009; BOSSART, 2011).

O conhecimento acerca da fauna parasitária que acomete estas espécies de mamíferos aquáticos ainda é bastante limitado e necessita de contribuições adicionais, como forma de obter entre outros aspectos positivos, informações sobre a saúde destes animais, aspectos biológicos dos parasitos identificados, como também as implicações destes agentes parasitários em termos de saúde pública.

Para promover contribuições neste aspecto, este trabalho foi desenvolvido em diversos estados do Brasil, possibilitando ao longo do mesmo, a integração de pesquisadores e Centros de Pesquisa. As amostras obtidas ao longo do estudo, possibilitaram uma representação abrangente no aspecto territorial e contemplam informações inéditas e relevantes para o conhecimento dos protozoários e helmintos nos mamíferos aquáticos estudados.

Na intenção de aprimorar o diagnóstico para os diferentes agentes parasitários estudados, foi possível comparar a utilização de metodologias já utilizadas tradicionalmente, como também a avaliação de novas técnicas, como o FLOTAC, até então não utilizado em estudos envolvendo os mamíferos aquáticos.

Considerando este significativo aporte científico, com a utilização de novas tecnologias e a utilização de técnicas apropriadas, foi possível identificar diversos agentes etiológicos, tanto helmintos como protozoários, acometendo espécies de mamíferos aquáticos, ampliando as informações inerentes às novas áreas de ocorrência destes parasitos.

Todo este esforço para a realização deste trabalho, além do intuito de promover a geração de informações científicas, buscou condições para implementar as diretrizes definidas nas estratégias de conservação dos mamíferos aquáticos no Brasil, tendo em vista as ações contidas nos Planos de Ação Nacional para a Conservação dos Sirênios, Cetáceos e Pinípedes (ROCHA-CAMPOS et al., 2010; ANDRADE et al., 2011; ROCHA-CAMPOS e GUSMÃO-CÂMARA, 2011).

Além disto, a ocorrência dos agentes etiológicos diagnosticados nos mamíferos aquáticos permitiu estabelecer uma compreensão prévia sobre a qualidade dos *habitats* utilizados pelos

espécimes avaliados, tendo em vista que estes animais são considerados sentinelas ambientais. Desta forma, os resultados obtidos, representam contribuições adicionais aos Planos de Manejo das Áreas de Proteção Ambiental (APA), da Barra do Rio Mamanguape e Costa dos Corais, respectivamente nos estados da Paraíba, Pernambuco e Alagoas.

Este fato é de grande relevância, pois evidenciou uma parcela dos riscos que as populações humanas estão susceptíveis, sobretudo aquelas que utilizam de forma intrínseca os recursos aquáticos, seja para coleta e/ou pesca de itens alimentares (ostra, mariscos, peixes, caranguejos), atividades de lazer ou ainda para atividades de uso pessoal (atividades domésticas e de higiene), tornando-se expostos da mesma maneira que os mamíferos aquáticos, aos riscos de infecção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Área marítima e bacias da região Amazônica do Brasil

A zona costeira e marinha do Brasil estende-se da foz do rio Oiapoque, cabo Orange (4°N), no estado do Amapá, ao norte, até a foz do Arroio Chuí (33°S), Rio Grande do Sul, ao sul, projetando-se ainda, ao nordeste, para incluir as áreas no entorno do Atol das Rocas e dos arquipélagos de Fernando de Noronha e de São Pedro e São Paulo, e ao leste, a ilha de Trindade e o arquipélago de Martim Vaz. Desta forma, o Brasil possui uma das maiores faixas costeiras do mundo, com cerca de 10.800 Km, ao longo dos 17 estados litorâneos (MORAES, 2007; LODI e BOROBIA, 2013).

A área marítima jurisdicional brasileira compreende aproximadamente 3,5 milhões de Km². Esta é integrada pelo mar territorial brasileiro, de 12 milhas náuticas de largura (22,2 Km), as ilhas costeiras e oceânicas e a plataforma continental. Adicionalmente a Organização das Nações Unidas (ONU) aprovou o pleito brasileiro pela incorporação de mais 712 mil Km² de extensão da plataforma continental para além das 200 milhas náuticas (LODI e BOROBIA, 2013).

As bacias dos rios Amazonas e Tocantins formam a maior parte da Amazônia, mas também incluem as Guianas e parte do Maranhão, cujos rios drenam para o oceano Atlântico. Duas características são dominantes na região, sendo a floresta tropical úmida e a imensidão das águas, onde o rio Amazonas e os seus afluentes formam a maior bacia hidrográfica do mundo, totalizando 6.869.000 Km² de área de drenagem se a bacia do rio Tocantins for incluída (CUNHA et al., 2007; LODI e BOROBIA, 2013).

A amplitude destes recursos hídricos e a sua heterogeneidade ambiental, constituem fatores de fundamental importância para a manutenção da alta biodiversidade (LODI e BOROBIA, 2013). Mediante a estas condições, em águas de jurisdição brasileira é constatada a ocorrência de diversas espécies de mamíferos aquáticos (BRASIL, 2001; ROCHA-CAMPOS et al., 2010; ROCHA-CAMPOS e GUSMÃO-CÂMARA, 2011).

2.2. Mamíferos aquáticos

São considerados mamíferos aquáticos os animais que dependem, no todo ou em parte, do ambiente aquático para desempenhar atividades inerentes ao seu ciclo vital (JEFFERSON et al., 1993), sobretudo para a obtenção dos seus recursos alimentares (LODI e BOROBIA, 2013).

Entre os mamíferos aquáticos é de conhecimento a ocorrência de 141 espécies viventes e recentemente extintas (LODI e BOROBIA, 2013), constituindo assim, um grupo faunístico diversificado, o qual está representado pela Ordem Cetartiodactyla que insere os cetáceos (baleias, botos e golfinhos), Sirenia (peixes-bois e dugongos) e Carnívora. Dentro dessa última Ordem, são

considerados mamíferos aquáticos os representantes das subordens Pinnipedia (lobos-marinhos, leões-marinhos, elefantes-marinhos, focas e morsas) e das famílias Mustelidae (lontras e ariranhas) e Ursidae (urso-polar) (LODI e BOROBIA, 2013).

No Brasil, nos ambientes marinhos e fluviais, já foram reportadas 48 espécies de cetáceos (ROCHA-CAMPOS et al., 2010; HRBEK et al., 2014), sete pinípedes (ROCHA-CAMPOS e GUSMÃO-CÂMARA, 2011), duas espécies de mustelídeos (BRASIL, 2001) e duas de sirênios (ANDRADE et al., 2011). Considerando as diferentes características ecológicas destas espécies, estas podem ser encontradas em ambientes oceânicos, costeiros, estuarinos e de águas interiores (PERRIN et al., 2002; REEVES et al., 2002; BASTIDA et al., 2007; ROCHA-CAMPOS et al., 2010; ROCHA-CAMPOS e GUSMÃO-CÂMARA, 2011).

2.3 Fatores de risco à conservação dos mamíferos aquáticos

Historicamente a caça, tanto em escala comercial como de subsistência, foi a atividade humana que mais afetou a abundância dos mamíferos aquáticos, reduzindo as estimativas existentes a baixos níveis populacionais, seja no âmbito global (CULIK, 2004), como também no Brasil (ZERBINI et al., 1997; LUNA et al., 2008).

Ao longo do tempo, os impactos da caça foram reduzidos com a mudança dos hábitos das populações humanas, embora não tenham sido ainda completamente eliminadas (IPCC, 2002; GRAVENA et al., 2008). Em tempos contemporâneos, novas ameaças configuram-se como fatores de preocupações, tais como as capturas incidentais e intencionais (SICILIANO, 1994; PIZZORNO et al., 1998; GREIG et al., 2001; MEIRELLES et al., 2009), abate por competição (CULIK, 2004), colisão com embarcações (BORGES et al., 2007a; CONSTANTINE et al., 2015), poluição sonora nos ambientes marinhos e fluviais (FINNERAN et al., 2015), alterações climáticas (ALTER et al., 2015), turismo de observação desordenado (UNEP, 2006; PEREIRA et al., 2007) barragens, represamento (REEVES e LEATHRWOOD, 1994) e perda de habitats (IPCC, 2002; PARENTE et al., 2004).

Além destes fatores, é importante considerar que os mamíferos aquáticos, em diversas ocasiões, habitam interfaces de ambientes onde ocorre uma interação muito significativa com as populações humanas, já que compartilham os mesmos habitats e, frequentemente, exploram recursos similares. Em consequência disso, são susceptíveis às transformações e às perturbações de origem antrópica, de tal modo que, atualmente muitas espécies têm sido expostas a compostos químicos e elementos-traço introduzidos nos sistemas aquáticos (ROCHA-CAMPOS et al., 2010; HOYDAL et al., 2015; LIU et al., 2015; TORRES et al., 2015).

Como consumidores de topo de cadeia trófica e animais de vida longa, estão sujeitos aos efeitos de biomagnificação, podendo ocasionar dentre outras consequências, danos aos sistemas reprodutivos, imune e endócrino (KUNITO et al., 2004; DORNELES et al., 2008; ANZOLIN et al., 2012).

Se não obstante os fatores mencionados, as diversas espécies de mamíferos aquáticos são acometidas por um grande número de agentes etiológicos, seja de natureza viral (RECTOR et al., 2004; KIRK et al., 2010), bacteriana (VERGARA-PARENTE et al., 2003; LOCKWOOD et al., 2006) ou de origem parasitária (CAVALLERO et al., 2011).

2.4 Parasitos em mamíferos aquáticos

Além de sua importância econômica e sanitária, os parasitos são parte integrante da biosfera (RAGA et al., 2009), onde em virtude da sua diversidade e mecanismos de ação, estes infectam muitos organismos livres, influenciando entre outras coisas, a saúde do hospedeiro, tamanho e comportamento de populações, dinâmica da cadeia alimentar e estrutura de comunidades (DAILEY, 2001; RAGA et al., 2009).

Neste contexto, as pesquisas envolvendo os parasitos descritos em mamíferos aquáticos têm aportado importantes contribuições à temática taxonômica, distribuição, filogenia, hábitos alimentares, estoques populacionais e aspectos patológicos, procurando sempre que possível, associar a severidade das infecções à morbidade e mortalidade de indivíduos e/ou populações (MOSER, 1991; RAGA et al., 1997; DAILEY, 2001; DELPORT et al., 2014).

Contudo, o efeito do parasitismo em mamíferos aquáticos é pouco conhecido, considerando muitas vezes as dificuldades em obter amostras destes animais (BOSSART, 2001), a compreensão limitada das relações existentes entre os hospedeiros e a biologia dos parasitos, bem como as limitações encontradas para o desenvolvimento de estudos experimentais (RAGA et al., 1997). Entretanto, recentemente, muitos agentes parasitários têm sido descritos em virtude do interesse crescente por estes organismos e a utilização de novas técnicas de diagnóstico (RAGA et al., 2009).

Entre os agentes etiológicos relatados com maior frequência acometendo os mamíferos aquáticos, destaca-se uma certa diversidade de helmintos gastrointestinais, tanto nematódeos (DAILEY e PERRIN, 1973; OWEN et al., 2012), como trematódeos (MORA-PINTO, 2000; BANDO et al., 2014), cestódeos (HOBERG et al., 1997; BERÓN-VERA et al., 2001) e acantocéfalos (ANDRADE et al., 2001).

Os protozoários têm sido reportados em menor frequência, talvez devido a amostras insuficientes ou porque estes agentes apresentam uma menor prevalência do que quando comparado as infecções ocasionadas por helmintos (RAGA et al., 2009). Entretanto, já foram

descritas infecções ocasionadas por *Cystoisospora delphini* (RAGA et al., 2009), *Toxoplasma gondii* (DUBEY et al., 2003), *Eimeria* spp. (UPTON et al., 1989), *Cryptosporidium* spp. (BORGES et al., 2011), *Giardia duodenalis* (DELPORT et al., 2014), *Sarcocystis* sp. (RAGA et al., 2002).

A susceptibilidade dos mamíferos aquáticos a estes diferentes agentes parasitários ocorre tanto com animais de vida livre, expostos as diversas condições de habitats (GIBSON et al., 2011), como também aos animais mantidos em cativeiro, sobretudo nos locais onde o sistema de tratamento físico-químico e microbiológico não apresenta a eficiência desejada (BORGES et al., 2007b; BANDO et al., 2014).

A transmissão destes agentes parasitários, em termos gerais, pode ocorrer de forma direta, de hospedeiro para hospedeiro, ou de forma indireta, por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados (MÉNDEZ-HERMIDA et al., 2007). Com relação aos animais mantidos em cativeiro, o contato com pessoas pode representar um importante meio de veiculação destes patógenos, sobretudo em decorrência de práticas de higiene inadequadas (BORGES et al., 2007c).

2.4.1 Ciclo evolutivo

O ciclo de vida de muitos destes agentes ainda não está bem elucidado, mas segundo alguns autores, estes muitas vezes devem ser similares aos de animais terrestres (RAGA et al., 2002). Sabe-se ainda, que grande parte dos parasitos digenéticos possuem ciclos heteroxenos, porém sugere-se que na família Notocotyliidae, a exemplo das infecções ocasionadas pelo gênero *Ogmogaster* em determinadas espécies de baleias, as larvas do tipo cercárias podem não precisar de um segundo hospedeiro, encistando diretamente nos crustáceos que servem de presas para os cetáceos (RAGA et al., 2002).

É reconhecido que para o ciclo de alguns helmintos, determinadas espécies de peixes, lulas, crustáceos e moluscos podem atuar como hospedeiros intermediários (RAGA et al., 2002), sendo estes constituintes direto ou indireto dos itens alimentares ingeridos por diversas espécies de mamíferos aquáticos (BORGES et al., 2008).

A exemplo das infecções ocasionadas por algumas espécies de trematódeos acometendo os sirênios, os estágios larvais podem encontrar-se aderido à vegetação aquática ou em crustáceos e moluscos, também fixados aos bancos de algas-marinhas e fanerógamas. Tendo em vista o comportamento herbívoro destes animais, por meio da alimentação, pode ocorrer a ingestão acidental das fases larvais dos helmintos (MORA-PINTO, 2000).

Entre os nematódeos, a família Anisakidae é provavelmente a que apresenta o melhor potencial para colonizar hospedeiros e muitos ambientes. Os anisquídeos de cetáceos pertencem

aos gêneros *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Anisakis*. Este último é encontrado com maior frequência e tem sido reportado em aproximadamente 35 espécies, incluindo golfinhos de rio (RAGA et al., 2002). O ciclo de vida de *Anisakis* é simples e um dos poucos bem documentado, de forma que com a eliminação das fezes contendo os ovos, estes apresentam uma larva de vida livre, a qual é posteriormente ingerida por crustáceos planctônicos. Os peixes e lulas infectam-se após a ingestão destes crustáceos, os quais podem ser consumidos posteriormente por algumas espécies de mamíferos aquáticos. As larvas evoluem para a fase adulta e permanecem localizadas no estômago, onde ocorre a liberação dos ovos (RAGA et al., 2002).

Para os ciclos de alguns protozoários relatados acometendo os mamíferos aquáticos (DUBEY et al., 2003; HUGHES-HANKS et al., 2005; BORGES et al., 2011), acredita-se que as fezes dos hospedeiros infectados podem acarretar na contaminação dos recursos hídricos (FAYER et al., 2004) e por meio da ingestão da água e alimentos contaminados pode haver a disseminação da infecção dos agentes para um maior número de hospedeiros (HUGHES-HANKS et al., 2005; DELPORT et al., 2014).

De acordo com as constatações, nos diferentes hospedeiros acometidos por *Cryptosporidium* spp., ocorre um ciclo monoxeno (GELLIN e SOAVE, 1992; DONNELLY e STENTIFORD, 1997; SMITH e ROSE, 1998). Os oocistos são excretados nas fezes de um hospedeiro infectado e a fase endógena começa após estes serem ingeridos por um hospedeiro susceptível. Em decorrência de fatores como a temperatura corporal, enzimas proteolíticas e sais biliares ocorre o rompimento da parede dos oocistos no intestino delgado, possibilitando a liberação dos esporozoítos (SMITH e ROSE, 1998).

Estes penetram nas microvilosidades da célula epitelial do intestino delgado, formando um vacúolo parasitóforo, envolvido por membranas de células hospedeiras e do próprio parasito (SMITH, 1993). Os esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos e a multiplicação assexuada chamada de merogonia resulta na formação de dois tipos de merontes, o tipo I e tipo II, que liberam oito e quatro merozoítos respectivamente. Somente merozoítos de merontes tipo II iniciam o ciclo sexuado (gametogonia), onde os merozoítos diferenciam-se em microgametócitos ou macrogametócitos (SMITH e ROSE, 1998).

Cada macrogametócito é fertilizado por um microgameta, onde o produto da fertilização, o zigoto, desenvolve-se dentro de um oocisto, sofrendo meiose e originando quatro esporozoítos (esporogonia). De acordo com Smith e Rose (1998), ocorre a formação de dois tipos de oocistos, sendo um de parede espessa e resistente e outro de parede fina. O primeiro é liberado no lúmen do intestino e excretado nas fezes, podendo infectar outro animal susceptível, enquanto que o segundo

tipo de oocistos, que apresenta a parede fina, pode romper dentro do próprio hospedeiro e causar a autoinfecção (SMITH, 1993; O'DONOGHUE, 1995; XIAO et al., 2004).

Ao que diz respeito ao ciclo evolutivo de *Giardia*, o hospedeiro infecta-se ingerindo os cistos. Após a ingestão, estes passam pelo ambiente ácido do estômago e ocorre a formação dos trofozoítos. Cada trofozoíto fixa-se na mucosa intestinal e divide-se por divisão binária. Alguns destes trofozoítos desprendem-se da mucosa e iniciam o processo de encistamento na porção final do intestino delgado. Posteriormente os cistos formados são eliminados junto com as fezes dos hospedeiros (THOMPSON et al., 1990).

2.4.2 Sinais clínicos e manifestações patológicas

A gravidade das lesões ocasionadas pelos parasitos está relacionada ao tipo de agente etiológico envolvido, sua abundância, o estado imunológico do hospedeiro e a ocorrência de outros agentes patogênicos associados (SMITH e ROSE, 1998; RAGA et al., 2002). Considerando estes aspectos, os efeitos descritos em decorrência à ação dos parasitos, geralmente apresentam pouco impacto na saúde dos animais acometidos (BOSSART, 2001), por vezes já considerados irrelevantes, sem sinais observáveis ou desencadeadores de manifestações patológicas em mamíferos aquáticos (DIERAUF, 1990). Entretanto, em algumas situações podem promover lesões importantes, comprometendo a saúde dos seus hospedeiros e levá-los a morte (RAGA et al., 2002).

Nas infecções ocasionadas por helmintos, estes parasitos podem ser encontrados em diferentes localizações do trato respiratório e gastrointestinal (HOBERG et al., 1997; CARVALHO et al., 2009). Em algumas situações os parasitos pulmonares podem provocar quadros de broncopneumonia e óbito, conforme já observado em pinípedes, golfinhos e peixes-bois marinhos (BECK e FORRESTER, 1988; ONDERKA, 1989; BAKER e MARTIN, 1992). Nas infecções gastrointestinais maciças pode ocorrer a presença de úlceras, gastrites e enterites hemorrágicas, associado a quadros de desidratação e anemia (DAILEY, 2001).

Ainda em decorrência à ação dos nematódeos, alguns agentes podem ocasionar sérios danos nas estruturas renais, aparelho geniturinário, placenta e músculos (DAILEY, 2001).

No que concerne às infecções ocasionadas por protozoários, a presença de *Cryptosporidium* spp., tanto em peixes-bois marinhos como em dugongos, com sinais clínicos de diarreia, anorexia, perda de peso e letargia tem sido reportada (DENG et al., 2000; BORGES et al., 2009). Adicionalmente, em algumas ocasiões foram descritos transtornos entéricos ocasionados por *Giardia* sp. em pinípedes (APPELBEE et al., 2010; DELPORT et al., 2014).

Além destas evidências clínicas, determinados parasitos podem interferir significativamente na dinâmica populacional de algumas espécies de mamíferos aquáticos, influenciando aspectos reprodutivos ou taxas de sobrevivência (RAGA et al., 2002). Constatações desta natureza foram retratadas em casos de mastite ocasionada pelo nematóide *Crassicauda* em cetáceos, ocasião em que ocorreu o comprometimento da glândula mamária, afetando a quantidade e qualidade do leite, e posteriormente a sobrevivência do filhote (GERACI et al., 1978; RAGA e BALBUENA, 1993).

Casos de neuropatias ocasionados pela infecção por helmintos e protozoários como *Nasitrema* sp. e *Toxoplasma gondii* têm sido relatados como o fator responsável para o encalhe do espécime acometido ou em massa (DAILEY e WALKER, 1978; MORIMITSU et al., 1987).

2.4.3 Diagnóstico

Grande parte das descrições envolvendo os diferentes agentes parasitários acometendo os mamíferos aquáticos foram provenientes de informações obtidas durante os estudos *post-mort*, realizados em carcaças necropsiadas (BECK e FORRESTER, 1988; ALTIERI et al., 2007) e o conhecimento sobre a identificação das formas imaturas dos helmintos ainda é limitado (BANDO et al., 2014).

No entanto, contribuições significativas vêm sendo apresentadas por meio de diferentes técnicas laboratoriais empregadas, como o exame direto, flutuação e sedimentação, sendo estes utilizados para identificar ovos de helmintos e cistos ou oocistos de protozoários (UPTON et al., 1989; BORGES et al., 2011; BANDO et al., 2014). Com esta mesma finalidade, nos últimos anos foi proposto o uso do FLOTAC, sendo esta uma nova técnica multivalente para a identificação qualitativa e quantitativa de diferentes agentes parasitários (CRINGOLI et al., 2010).

Em decorrência ao tamanho de alguns coccídios, técnicas mais específicas vêm sendo utilizadas, a exemplo das pesquisas envolvendo o diagnóstico de *Cryptosporidium* sp., as quais dispõem do uso de corantes como Ziehl-Nielsen, Kinyoun, 4'-6' diamidino-2-phenilindole, DAPI (BORGES et al., 2009; BORGES et al., 2011), além de métodos imunológicos como a reação de imunofluorescência direta (BORGES et al., 2011).

Além destas técnicas mencionadas, estudos utilizando as ferramentas de biologia molecular com o objetivo de obter métodos de diagnósticos mais sensíveis (CAVALLERO et al., 2011), estão sendo cada vez mais utilizados e permitindo com isto, a identificação de novas espécies, bem como a definição de suas implicações para a saúde pública e animal (DELPORT et al., 2014).

2.4.4 Implicações para a Saúde Pública

O aumento das zoonoses encontra-se impulsionado por uma complexa interação de fatores ambientais (aquecimento global, acidificação dos oceanos, poluição), ecológico (destruição de habitat ou fragmentação) e epidemiológico (aumento da densidade de humanos invadindo e limitando o espaço de populações silvestres, movimentos globais de plantas e animais) (VAN BRESSEM et al., 2009; BOSSART, 2011). Neste contexto, as populações humanas estão apresentando um grande impacto nos ambientes marinhos e fluviais, interferindo negativamente nos mamíferos aquáticos (BEJDER et al., 2006).

Historicamente o impacto zoonótico entre os mamíferos aquáticos e os seres humanos estava mais direcionado aos caçadores, por vezes dispendo de cuidados médicos precários ou indígenas que se alimentavam de carne destes animais (BUCK e SCHROEDER, 1990). Em tempos contemporâneos, o conhecimento sobre a diversidade de patógenos de mamíferos aquáticos está se expandindo, sendo evidenciadas as implicações dos agentes parasitários (BOSSART, 2011; GIBSON et al., 2011).

Com a proibição da caça em muitos países e sendo os mamíferos aquáticos considerados espécies carismáticas, em diversas localidades vêm sendo ampliado o turismo de observação destas espécies, bem como, em diversos parques aquáticos é possível nadar ou mergulhar com golfinhos, lobos-marinhos e peixes-bois marinhos (WALTZEK et al., 2012). Além disso, com o interesse científico e conservacionista nestes animais, tem-se intensificado o número de profissionais envolvidos nos centros de pesquisa e reabilitação (MOTTA et al., 2005).

Em todas estas ocasiões, tanto o público em geral como os profissionais envolvidos com as atividades de pesquisa e manejo dos mamíferos aquáticos encontram-se mais vulneráveis aos riscos de se infectarem por determinados patógenos provenientes destes animais, em detrimento muitas vezes da exposição ocupacional estendida, seja em virtude do contato direto, como também em decorrência à manipulação de amostras biológicas (MOTTA et al., 2005; HUNT et al., 2008). Algumas zoonoses documentadas foram resultantes de infecções adquiridas durante as necropsias ou processamento dos tecidos infectados (SARGENTE, 1980).

Os agentes são comumente oportunistas e aproveitam determinadas situações para invadir o novo hospedeiro. Esforços de resgate e reabilitação de animais encalhados envolvem geralmente intensa manipulação para alimentação e tratamento. Esses animais já debilitados, em sua maioria, apresentam doença crônica ou em desenvolvimento, aumentando assim as chances de transmissão (BUCK e SCHROEDER, 1990; COWAN et al., 2001).

Entre os agentes parasitários de implicação zoonótica em mamíferos aquáticos têm-se destacado a ocorrência do *Toxoplasma gondii* (COWAN et al., 2001), *Giardia* sp. (REBOREDO-

FERNÁNDEZ et al., 2015) e *Cryptosporidium* spp. (DELPORT et al., 2014). Estes agentes apresentam uma rápida disseminação nos recursos hídricos podendo contaminar diversos organismos aquáticos utilizados na alimentação das populações humanas, como mariscos, ostras, peixes, entre outros (GÓMES-COUSO et al., 2006; KOINARI et al., 2013), representando um alto potencial zoonótico, sobretudo em virtude das bacias hidrográficas servirem como uma das principais fontes de alimento e água para os seres humanos (JESSUP et al., 2004; BOSSART, 2011; GIBSON et al., 2011).

2.5 Mamíferos aquáticos como sentinelas da qualidade dos recursos marinhos e fluviais

O conceito de espécies sentinelas para o monitoramento dos ambientes marinhos e fluviais vem sendo aplicado em diversas regiões e utilizando os mamíferos aquáticos como elementos indicadores da qualidade ambiental (BONDE et al., 2004; BOSSART, 2011).

Isto é possível em virtude dos mamíferos aquáticos apresentarem grande longevidade, utilizarem ambientes costeiros, oceânicos, marinhos e fluviais, assim como por vezes compartilham habitats também utilizado por populações humanas e estão sujeitos às perturbações de natureza antropogênica, capazes de influenciar negativamente a distribuição e a manutenção destas espécies (ROCHA-CAMPOS et al., 2010; ROCHA-CAMPOS e GUSMÃO-CÂMARA, 2011).

Esta fragilidade às alterações confere às diversas espécies de mamíferos aquáticos a capacidade de cumprir funções de indicadores de comunidades biológicas íntegras, e "sentinelas" da variabilidade e degradação dos ecossistemas (AGUIRRE e TABOR, 2004).

Este conceito de espécie sentinela pode ser útil para fornecer um alerta rápido sobre a ocorrência de determinadas doenças emergentes ou ainda monitorar o curso e propagação de determinados agentes etiológicos, fornecendo indicativos para a adoção de medidas de controle e prevenção (BONDE et al., 2004). Alguns autores reportam a aplicação do conceito "espécies-sentinela" a algumas espécies das ordens Carnívora (PARERA, 1996), Cetartiodactyla (SICILIANO et al., 2005) e Sirenia (BONDE et al., 2004).

Estudos onde os mamíferos aquáticos atuaram como indicadores de contaminação aquática possibilitaram despertar a atenção para as infecções ocasionadas por *Cryptosporidium* spp., *Giardia* sp. e *Toxoplasma gondii* (DENG et al., 2000; DUBEY et al., 2003; APPELBEE et al., 2010) acometendo os cetáceos (DUBEY et al., 2003; ALTIERI et al., 2007), sirênios (BORGES et al., 2009) e pinípedes (DENG et al., 2000). Estes agentes são considerados como oportunistas (XIAO et al., 1998), de distribuição cosmopolita (CURRENT, 1983) e com o potencial zoonótico de transmissão (FAYER et al., 2004).

2.6 Referências

AGUIRRE, A. A.; TABOR, G. M. (2004) Introduction: marine vertebrates as sentinels of marine ecosystem health. *Ecohealth*,1:236-238.

ALTER, S. E.; MATTHIAS, M.; KLASS, P.; PAUL, C.; PETER, G.; CORK, G.; HOWARD, C. R.; KRISTIN, K.; SAMUEL, T. T.; JOHANNES, V. D. P.; BETH, S.; MICHAEL, H. (2015) Climate impacts on transocean dispersal and habitat in gray whales from the Pleistocene to 2100. *Mol Ecol*, 24(7):1510-1522.

ALTIERI, B. L.; VIANNA, D. A.; MEIRELLES, A. C. O. (2007) Isolation of *Giardia* sp. from an estuarine dolphin (*Sotalia guianensis*) in Ceará state, Northeastern Brazil. *LAJAM*, 6(1):113-116.

ANDRADE, A.; PINEDO, M. C.; BARRETO, A. S. (2001) Gastrointestinal parasites and prey items from a mass stranding of false killer whales, *Pseudorca crassidens*, in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Rev Bras Biol*, 61(1):55-61.

ANDRADE, M. C. M.; LUNA, F. O.; REIS, M. L. (2011) Plano de ação nacional para a conservação dos mamíferos aquáticos: sirênios. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 80 p.

ANZOLIN, D. G.; SARKIS, J. E. S.; DIAZ, E.; SOARES, D. G.; SERRANO, I. L.; BORGES, J. C. G.; SOUTO, A. S.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R. C.; BAINY, A. C. D.; CARVALHO, P. S. M. (2012) Contaminant concentrations, biochemical and hematological biomarkers in blood of West Indian manatees *Trichechus manatus* from Brazil. *Mar Pollut Bull*, 64:1402-1408.

APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; MEASURES, L. M.; OLSON, M. E. (2010) *Giardia* and *Cryptosporidium* in harp and hooded seals from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Vet Parasitol*, 173:19-23.

BAKER, J. R.; MARTIN, A. R. (1992) Causes of mortality and parasites and incidental lesions in dolphins and whales from British Waters. *Vet Rec*, 130:569-572.

BANDO, M.; LARKIN, I. V.; WRIGHT, S. D.; GREINER, E. C. (2014) Diagnostic stages of the parasites of the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*. *J Parasitol*, 100:133-138.

BASTIDA, R.; RODRIGUEZ, D.; SECCHI, E. R.; DA SILVA, V. M. F. (2007) Mamíferos acuáticos de Sudamérica y Antártida. Buenos Aires: Vazquez Mazzini Editores, 360 p.

BECK, C.; FORRESTER, D. J. (1988) Helminths of the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*, with a discussion and summary of the parasites of Sirenians. *J Parasitol*, 74:628-637.

BEJDER, L.; SAMUELS, A.; WHITEHEAD, H.; GALES, N.; MANN, J.; CANNOR, R.; HEITHAUS, M.; WATSON-CAPPS, J.; FLAHERTY, C.; KRUEZEN, M. (2006) Decline in relative abundance of bottlenose dolphins exposed to long-term disturbance. *Conserv Biol*, 20:1791-1798.

BERÓN-VERA, B.; PEDRAZA, S. N.; RAGA, J. A.; PERTIERRA, A. G.; CRESPO, E. A.; ALONSO, M. K.; GOODALL, R. N. (2001) Gastrointestinal helminths of Commerson's dolphins *Cephalorhynchus commersonii* from central Patagonia and Tierra del Fuego. *Dis Aquat Organ*, 47:201-208.

BONDE, R.; AGUIRRE, A. A.; POWELL, J. (2004) Manatees as sentinels of marine ecosystem health: are they the 2000 pound canaries? *EcoHealth*, 1:255-262.

BORGES, J. C. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G.; MARMONTEL, M. (2011) Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Antillean manatees (*Trichechus manatus*) and Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*) from Brazil. *J Zoo Wildl Med*, 42:593-596.

BORGES, J. C. G.; ALVES, L. C.; VERGARA-PARENTE, J. E.; FAUSTINO, M. A. G.; MACHADO, E. C. L. (2009) Ocorrência de infecção *Cryptosporidium* spp. em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*). Rev Bras Parasit Vet, 18(1):60-61.

BORGES, J. C. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G.; GOMES, J. K. N.; LIMA, R. P. (2007b) Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água destinada a manutenção dos peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) em cativeiro. Biotemas, 20(3):67-74.

BORGES, J. C. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G.; LIMA, R. P. (2007c) Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) e funcionários envolvidos no manejo da espécie. Estud Biol. 29(66):33-41.

BORGES, J. C. G.; ARAÚJO, P. G.; ANZOLIN, D. G.; MIRANDA, G. E. C. (2008) Identificação de itens alimentares constituintes da dieta dos peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) na região Nordeste do Brasil. Biotemas, 21(2):77-81.

BORGES, J. C. G.; VERGARA-PARENTE, J. E.; ALVITE, C. M. C.; MARCONDES, M. C. C.; LIMA, R. P. (2007a) Embarcações motorizadas: uma ameaça aos peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) no Brasil. Biota Neotropica, 7(3):199-204.

BOSSART, G. D. (2001) Manatees. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. (Eds) Handbook of marine mammals medicine. CRC Press, Boca Raton, USA. p. 939-958.

BOSSART, G. D. (2011) Marine mammals as sentinel species for ocean and human health. Vet Pathol, 48(3):676-690.

BRASIL. (2001) Mamíferos aquáticos do Brasil: plano de ação, versão II. Brasília: Ed. Diretoria de Fauna e dos Recursos Pesqueiros/IBAMA, 96 p.

BUCK, C. D.; SCHROEDER, J. P. (1990) Public Health Significance of Marine Mammal Disease. In: DIERAUF, L. A (ed). CRC Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease and Rehabilitation. Boca Raton: CRC Press, p. 163-173.

CARVALHO, V. L.; MEIRELLES, A. C. O.; MOTTA, M. R. A.; MAIA, D. C. B. S. C. M.; CAMPELLO, M. V. M.; BEVILAQUA, C. M. L. (2009) Occurrence of *Pulmonicola cochleotrema* (Syn. *Cochleotrema cochleotrema*) (Digenea: Opisthotrematidae) in Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*) in Brazil. Lat Am J Aquat Mamm, 7:47-52.

CAVALLERO, S.; NADLER, S. A.; PAGGI, L.; BARROS, N. B.; D'AMELIO, S. (2011) Molecular characterization and phylogeny of anisakid nematodes from cetaceans from southeastern Atlantic Coasts of USA, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. Parasitol Res, 108:781-792.

CONSTANTINE, R.; MARK, J.; LEENA, R.; STEPHANIE, J.; LILY, K. L.; TODD, D.; LEIGH, G. T.; NATACHA, A. S. (2015) Mitigation of vessel-strike mortality of endangered Bryde's whales in the Hauraki Gulf, New Zealand. Biol Conserv, 186:149-157.

COWAN, D. F.; HOUSE, C.; HOUSE, J. A. (2001) Public Health. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. CRC Handbook of Marine Mammal. Second Edition: CRC Press. 1120 p.

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; MAURELLI, M. P.; UTZINGER, J. (2010) Flotac: new multivalente techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. Nature Protocols, 5(3): 503-515.

CULIK, B. M. (2004) Review of small cetaceans: distribution, behavior, migration and threats. Marine Mammal Action Plan/Regional Seas Report and Studies n 177. UNEP/CMS Secretariat, Bonn, Germany, 343 p.

CUNHA, P. R. C.; MELO, J. H. G.; SILVA, O. B. (2007) Bacias do Amazonas. B. Geoci., 15(2): 227-251.

CURRENT, W. L. (1983) Human cryptosporidiosis. NEJM, 309:614-615.

DAILEY, M. (2001) Parasitic diseases. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. Handbook of marine mammal medicine. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, p. 357-379.

DAILEY, M. P.; PERRIN, W. F. (1973) Helminth parasites of porpoises of the genus *Stenella* in the Eastern Tropical Pacific, with descriptions of two new species: *Mastigonema Stenellae* gen. et. sp. n. (Nematoda: Spiruroidea) and *Zalophotrema Pacificum* sp. n. (Trematoda: Digenea). Fish Bull, 71(2): 455-471.

DAILEY, M. D.; WALKER, W. A. (1978) Parasitism as a factor (?) in single strandings of Southern California cetaceans. J Parasitol, 64:593-596.

DELPORT, T. C.; ASHER, A. J.; BEAUMONT, L. J.; WEBSTER, K. N.; HARCOURT, R. G.; POWER, M. L. (2014) *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* occurrence in Australian sea lions (*Neophoca cinerea*) exposed to varied levels of human interaction. Int J Parasitol, 3:269-275.

DENG, M.; PETERSON, R. P.; CLIVER, D. O. (2000) First findings of *Cryptosporidium* and *Giardia* in California sea lions (*Zalophus californianus*). J Parasitol, 86:490-494.

DIERAUF, L. A. (1990) Marine mammal parasitology. Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease and Rehabilitation. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 89-96.

DONNELLY, J. K.; STENTFORD, E. I. (1997) The cryptosporidium problem in water and food supplies. Lebensm Wiss Technol, 30:111-120.

DORNELES, P. R.; LAILSON-BRITO, J.; AZEVEDO, A. F.; MEYER, J.; VIDAL, L. G.; FRAGOSO, A. B. L.; TORRES, J. P. M.; MALM, O.; BLUST, R.; DAS, K. (2008) High accumulation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in marine tucuxi dolphins from Brazilian Coast. Environ Sci Technol, 42:5368-5373.

DUBEY, J. P.; ZARNKE, R.; THOMAS, N. J.; WONG, S. K.; BONN, W. V.; BRIGGS, M.; DAVIS, J. W.; EWING, R.; MENSE, M.; KNOX, O. C. H.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. (2003) *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet Parasitol*, 16:275-296.

FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. (2004) Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol*, 20(11):531-536.

FINNERAN, J. J.; CAROLYN, E. S.; BRIAN, K. B.; JENNIFER, S. T.; VICTORIA, B.; KEITH, J. (2015) *J Acoust Soc Am*, 13(4):1634-1646.

GELLIN, B. J.; SOAVE, R. (1992) Coccidian Infections in AIDS. Toxoplasmosis, cryptosporidiosis and isosporiasis. *Med Clin N Am*, 76:205-234.

GERACI, J. R.; DAILEY, M. D.; ST AUBIN, D. J. (1978) Parasitic mastites in the Atlantic White-sided dolphin, *Lagenorhynchus acutus*, as a probable factor in herd productivity. *J Fish Res Board Can*, 35:1350-1355.

GIBSON, A. K.; RAVERTY, S.; LAMBOURN, D. M.; HUGGINS, J.; MAGARGAL, S. L.; GRIGG, M. E. (2011) Polyparasitism is associated with increased disease severity in *Toxoplasma gondii* infected marine sentinel species. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(5): e1142, doi: 10.1371/journal.pntd.0001142.

GÓMEZ-COUSO, H.; MÉNDEZ-HERMIDA, F.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; ARES-MAZÁS, E. (2006) *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. *J Food Prot*, 69:185-190.

GRAVENA, W.; HRBEK, T.; DA SILVA, V. M. F.; FARIAS, I. P. (2008) Amazon River dolphin love fetishes: From folklore to molecular forensics. *Mar Mammal Sci*, 969-978.

GREIG, A. B.; SECCHI, E. R.; ZERBINI, A. N.; ROSA, L. D. (2001) Stranding events of southern right whales, *Eubalaena australis*, in Southern Brazil. *J Cet Res Manage (Special Issue 2)*, 157-160.

HOBERG, E. P.; HENNY, O. R.; GROVE, R. A. (1997) Intestinal Helminths of River Otters (*Lutra canadensis*) from the Pacific Northwest. *J Parasitol*, 83(1):105-110.

HOYDAL, K.; ROBERT, J. L.; BLAIR, A. D.; DAM, M.; LOCKYER, C.; BJORN, M. (2015) Legacy and emerging organic pollutants in liver and plasma of long-finned pilot whales (*Globicephala melas*) from waters surrounding the Faroe Islands. *Sci Total Environ*, 520:270-285.

HRBEK, T.; SILVA, V. M. F. S.; DUTRA, N.; GRAVENA, W.; MARTIN, A. R.; FARIAS, I. P. A. (2014) New Species of river dolphin from Brazil or: How little do we know our biodiversity. *Plos One*, 9: p. e83623.

HUGHES-HANKS, J. M.; RICKARD, L. G.; PANUSKA, C.; SAUCIER, J. R.; O'HARA, T. M.; DEHN, L.; ROLLAND, R. M. (2005) Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in five marine species. *J Parasitol*, 91(5):1255-1228.

HUNT, T. D.; ZICCARDI, M. H.; GULLAND, F. M. D.; YOCHER, P. K.; HIRD, D. W.; ROWLES, T.; MAZET, J. A. K. (2008) Health risks for marine mammal workers. *Dis Aquat Org*, 81:81-92.

IPCC. (2002) *Climate change 2001: Synthesis Report*. Cambridge, New York: Cambridge University. 397 p.

JEFFERSON, T. A.; LEATHERWOOD, S.; WEBBER, M. A. (1993) *Marine mammals of the World: FAO species identification guide*. FAO/UNEP. Roma. 320 p.

JESSUP, D. A.; MILLER, M.; AMES, J.; HARRIS, M.; KREUDER, C.; CONRAD, P. A. MAZET, J. A. K. (2004) Southern sea otter as a sentinela of marine ecosystem health. *EcoHealth*, 1:239-245.

KIRK, C. M.; AMSTRUP, S.; SWOR, R.; HOLCOMB, D.; O'HARA, T. M. (2010) *Morbillivirus* and *Toxoplasma* exposure and association with hematological parameters for southern beafort sea polar bears: potential response to infectious agents in a sentinel species. *EcoHealth*, 7:321-331.

KOINARI, M.; KARL, S.; NG-HUBLIN, J.; LYMBERY, A. J.; RYAN, U. M. (2013) Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in fish from Papua New Guinea. *Vet Parasitol*, 198:1-9.

KUNITO, T.; NAKAMURA, S.; IKEMOTO, T.; ANAN, Y.; KUBOTA, R.; TANABE, S.; ROSAS, F. C. W.; FILLMANN, G.; READMAN, J. W. (2004) Concentration and subcellular distribution of trace elements in liver of small cetaceans incidentally caught along the Brazilian coast. *Mar Pollut Bull*, 49:574-587.

LIU, J. Y.; CHOU, L. S.; CHEN, M. H. (2015) Investigation of trophic level and niche partitioning of 7 cetacean species by stable isotopes, and cadmium and arsenic tissue concentrations in the western Pacific Ocean. *Mar Pollut Bull*, 93(1-2):270-277.

LOCKWOOD, S. K.; CHOVAN, J. L.; GAYDOS, J. K. (2006) Aerobic bacterial isolations from harbor seals (*Phoca vitulina*) stranded in Washington: 1992-2003. *J Zoo Wildlife Med*, 37(3):281-291.

LODI, L.; BOROBIA, M. (2013) Baleias, botos e golfinhos do Brasil: Guia de identificação. 1. Ed. Rio de Janeiro: technical Books, 479 p.

LUNA, F. O.; ARAÚJO, J. P.; LIMA, R. P.; PESSANHA, M. M.; SOAVINSKI, R. J.; PASSAVANTE, J. Z. O. (2008) Captura e utilização do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) no litoral Norte do Brasil. *Rev Biotemas*, 21(1):115-123.

MÉNDEZ-HERMIDA, F.; GÓMEZ-COUSO, H.; ROMERO-SUANCES, R.; ARES-MAZÁS, E. (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild otters (*Lutra lutra*). *Vet Parasit*, 144:153-156.

MEIRELLES, A. C. O.; MONTEIRO-NETO, C.; MARTINS, A. M.; COSTA, A. F.; BARROS, H. M. D. R.; ALVES, M. D. O. (2009) Cetacean Strandings on the coast of Ceará, Northeastern Brazil (1992-2005). *JMBA*, 89(5):1083-1090.

MORAES, A. C. R. (2007) Contribuições para a gestão da zona costeira do Brasil: elementos para uma geografia do litoral brasileiro. São Paulo: Annablume, 237 p.

MORA-PINTO, D. M. (2000) Morphometric variation of the trematodes *Chiorchis fabaceus* and *C. groschafti* parasitic in the West Indian manatee (*Trichechus manatus*). Master, University of Puerto Rico, 90 p.

MORIMITSU, T.; NAGAL, T.; IDE, M.; KAWANO, H.; NAICHUU, A.; KOONO, M.; ISHII, A. (1987) Mass stranding of Odontoceti caused by parasitogenic eighth cranial neuropathy. *J Wildl Dis*, 23:586-590.

MOSER, M. (1991) Parasites as biological tags. *Parasitol Today*, 7(7):182-185.

MOTTA, M. R. A.; MARCONDES, M. C. C.; VERGARA-PARENTE, J. E. (2005) Saúde Pública. In: Protocolo de conduta de encalhes de mamíferos aquáticos. Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste. Recife. 298 p.

O'DONOGHUE, P. J. (1995) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol*, 25(2):139-95.

ONDERKA, D. (1989) Prevalence and pathology of nematode infections in the lungs of ringed seals (*Phoca hispida*) of the western Arctic of Canada. *J Wildl Dis*, 25:218-224.

OWEN, H.; GILLESPIE, A.; WILKLE, I. (2012) Postmortem findings from dugong (*Dugong dugon*) submissions to the University of Queensland: 1987-2010. *J Wildl Dis*, 48(4):962-970.

PARERA, A. (1996) Las "nutrias verdaderas" de la Argentina. *Boletín Técnico de la Fundación Vida Silvestre Argentina*. 21:1-38.

PARENTE, C.L.; VERGARA-PARENTE, J.E.; LIMA, R.P. (2004) Strandings of Antillean manatees, *Trichechus manatus manatus*, in Northeastern Brazil. *LAJAM*, 3(1):69-75.

PEREIRA, M. G.; BAZZALO, M. FLORES, P. A. C. (2007) Reações comportamentais na superfície de *Sotalia guianensis* (Cetacea, Delphinidae) durante encontros com embarcações na Baía Norte de Santa Catarina. Rev Bras Zooc, 9(2):123-135.

PERRIN, W. F.; WURSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. (2002) Encyclopedia of marine mammals. San Diego: Academic Press, 1414 p.

PIZZORNO, J. L. A.; LAILSON-BRITO, J. R.; DORNELES, P. R.; AZEVEDO, A. F.; GURGEL, I. M. G. N. (1998) Review of strandings and additional information on Humpback Whales, *Megaptera novaeangliae*, in Rio de Janeiro, Southeastern Brazilian Coast (1981-1997). Rep Int Whal Commn, 48:443-446.

RAGA, J. A.; BALBUENA, J. A.; AZNAR, J.; FERNÁNDEZ, M. (1997) The impact of parasites on marine mammals: a review. Parassitologia, 39:293-296.

RAGA, J. A.; BALBUENA, J. A. (1993) Parasites of the long-linned pilot whale, *Globicephala melas* (Traill, 1809), in Europe Waters. In: Biology of Northern Hemisphere Pilot Whales (Donovan, G.; Lockyer, C.H.; Martin, A. R. eds). Rep. Int. Whal. Comm. Special Issue 14, Cambridge, UK. p. 391-406.

RAGA, J. A.; FERNÁNDEZ, M.; BALBUENA, J. A.; AZNAR, F. L. (2002) Parasites. In: PERRIN, W. F.; WURSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. Encyclopedia of Marine Mammals (First Edition), p. 867-876.

RAGA, J. A.; FERNÁNDEZ, M.; BALBUENA, J. A.; AZNAR, F. L. (2009) Parasites. In: PERRIN, W. F.; WURSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. Encyclopedia of Marine Mammals (Second Edition), p. 821-830.

REBOREDO-FERNÁNDEZ, A.; ARES-MAZÁS, E.; MARTÍNEZ-CEDEIRA, J. A.; ROMERO-SUANCES, R.; CACCIO, S. M.; GÓMEZ-COUSO, H. (2015) *Giardia* and *Cryptosporidium* in cetaceans on the European Atlantic coast. Parasitol Res, 114:693-698.

RECTOR, A.; BOSSART, G. D.; GHIM, S. J.; SUNDBERG, J. P.; JENSON, A. B.; RANST, M. V. (2004) Characterization of a novel close-to-root papillomavirus from a Florida manatee by using multiply primed rolling-circle amplification *Trichechus manatus manatus* papillomavirus type 1. J Virol, 78(22):12698-12702.

REEVES, R. R.; LEATHERWOOD, S. (1994) Dolphins, porpoises and whales: 1994-1998 Action Plan for the Conservation of Cetaceans. IUCN – The World Conservation Union, Gland, Switzerland. 92 p.

REEVES, R. R.; STEWART, B. S.; CLAPHAM, P. J.; POWELL, J. A. (2002) Guide to marine mammals of the world. New York: Chanticleer press. 527 p.

ROCHA-CAMPOS, C. C.; GUSMÃO-CÂMARA, I.; PRETTO, D. J. (2010) Plano de ação nacional para a conservação dos mamíferos aquáticos: pequenos cetáceos. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, 132 p.

ROCHA-CAMPOS, C. C.; GUSMÃO-CÂMARA, I. (2011) Plano de ação nacional para conservação dos mamíferos aquáticos: grandes cetáceos e pinípedes. Versão III. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação de Conservação da Biodiversidade, 156 p.

SARGENT, E. (1980) Tetracycline for seal finger. J Am Med Assoc, 244: 436-437.

SICILIANO, S. (1994) Review of small cetaceans and fishery interactions in coastal Waters of Brazil. Pp. 241-250. In: W. F. PERRIN; G. P. DONOVAN; J. BARLOW (eds.). Gillnets and Cetaceans. Rep Int Whal Commn, Special Issue. 15:629.

SICILIANO, S; ALVES C. V.; HACON, S. (2005) Aves e mamíferos marinhos como sentinelas ecológicas da saúde ambiental: uma revisão do conhecimento brasileiro. CSC, 8:927-946.

SMITH, J. L. (1993) *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* as Agents of Foodborne Disease. J Food Protect, 56(5):451-461.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. (1998) Waterborne Cryptosporidiosis: Current status. *Parasitol Today*, 14:14-22.

THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. J.; MELONI, B. P. (1990) Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882 taxonomic and epidemiological significance. *Protozool Abst*, 4(1):1-28.

TORRES, P.; MIGLIORANZA, K. S. B.; UHART, M. M.; GONZALEZ, M.; COMMENDATORE, M. (2015) Organochlorine pesticides and PCBs in Southern right whales (*Eubalaena australis*) breeding at Península Valdes, Argentina. *Sci Total Environ*, 518:605-615.

UNEP. (2006) Wildlife Watching and Tourism: a study on the benefits and risks of a fast growing tourism activity and its impacts on species. United Nations Environment Programme/Convention on Migratory Species (CMS). 65 p.

UPTON, S. J.; ODELL, D. K.; BOSSART, G. D.; WALSH, M. T. (1989) Description of the Oocysts of Two New Species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Florida Manatee, *Trichechus manatus* (Sirenia: Trichechidae). *J Protozool*, 36(1):87-90.

VAN BRESSEM, M. F.; RAGA, J. A.; GUARDO, G. D.; JEPSON, P. D.; DUGNAN, P. J.; SIEBERT, U.; BARRETT, T.; SANTOS, M. C. O.; MORENO, I. B.; SICILIANO, S.; AGUILAR, A.; WAEREBEEK, K. V. (2009) Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Dis Aquat Organ*, 86:143-157.

VERGARA-PARENTE, J. E.; SIDRIM, J. J. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; MARCONDES, M. C. C.; ROCHA, F. G. (2003) Salmonellosis in an Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) calf: a fatal case. *Aquat Mammals*, 29(1):131-136.

WALTZEK, T. B.; CORTÉS-HINOJOSA, G.; WELLEHAN, J. F. X.; GRAY, G. C. (2012) Marine Mammal Zoonoses: a review of disease manifestations. *Zoonoses Public Health*: 1-15.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. (2004) *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin Microbiol Rev, 17(1):72-97.

XIAO, L.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; LAL, A. A. (1998) Species and Strain-specific Typing of *Cryptosporidium* Parasites in Clinical and Environmental Samples. Mem I Oswaldo Cruz, 93(5):687-692.

ZERBINI, A. N.; SECCHI, E. R.; SICILIANO, S.; SIMÕES-LOPES, P. C. (1997) A review of the occurrence and distribution of whales of the genus *Balaenoptera* along the Brazilian Coast. Rep Int Whal Commn, 47:407-417.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Diagnosticar infecções ocasionadas por *Cryptosporidium* spp., *Giardia* sp. e endoparasitos em mamíferos aquáticos no Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. envolvendo as espécies de mamíferos aquáticos de distribuição costeira e oceânica;
- Comparar a frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. entre as espécies de mamíferos aquáticos que utilizam os ambientes marinhos e aquelas que utilizam os ambientes fluviais;
- Comparar as principais técnicas laboratoriais para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* sp. e parasitas gastrointestinais de mamíferos aquáticos;
- Avaliar a frequência do parasitismo por helmintos em mamíferos aquáticos;
- Descrever o protocolo terapêutico utilizado no tratamento de *Pulmonicola cochleotrema* em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*).

4. CAPÍTULO I

***Pulmonicola cochleotrema* (Digenea: Opisthotrematidae) in Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*) from the Northeastern region of Brazil**

Capítulo estruturado em formato de artigo e submetido para o periódico *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*.

4. *Pulmonicola cochleotrema* (Digenea: Opisthotrematidae) in Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*) from the Northeastern region of Brazil

Abstract

*Currently, little is known about the helminth fauna in sirenian species. Therefore, the objective of this study was to assess the frequency of infection by *Pulmonicola cochleotrema* in Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*), in the Northeast region of Brazil. Between the years of 1989 and 2014, 88 manatees found close to the Northeastern Brazilian coast were clinically examined. They included animals that were found dead, animals maintained in captivity and specimens reintroduced into conservation areas. During their physical examination, helminthes present in necropsied carcasses and in reintroduced animals were collected, as well as fecal samples. Parasites were detected in 7.95% (07/88) of the animals; all specimens collected being identified as *P. cochleotrema*. Only adult manatees were infected, and in two cases clinical signs were observed. This is the first report on the occurrence of *P. cochleotrema* in Antillean manatees in the states of Paraíba and Sergipe, in the Northeastern coast of Brazil.*

Keywords: Conservation; aquatic mammals; sirenians; helminth; trematode; parasite; parasitology; wildlife medicine; infection; clinical signs

INTRODUCTION

Antillean manatees are aquatic mammals that are considered vulnerable to extinction according to IUCN (2014), and endangered based on the Brazilian Red List (Mma, 2014). In Brazil, the presence of these animals has been reported on the coast and in estuary areas of all states from Amapá to Sergipe, with some discontinuous areas along the coast (Luna *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2013).

For a long time, the indiscriminate hunting of animals was considered the major threat to manatee conservation in Brazil (Domning, 1982; Lima *et al.*, 2011). Moreover, other factors such as accidental death in fishing nets (Meirelles, 2008), the silting of estuaries, environmental degradation (Nishida *et al.*, 2008; Icmbio, 2011), indiscriminate use of motorized boats (Borges *et al.*, 2007), contamination of water resources (Bonde *et al.*, 2004) and the stranding of manatees calves (Parente *et al.*, 2004; Meirelles, 2008) contributed to the reduction of the manatees population.

It is well known that the presence of certain pathogens such as bacteria (Vergara-Parente *et al.*, 2003), viruses (Ghim *et al.*, 2014), and parasites (Borges *et al.*, 2011; Bando *et al.*, 2014) may interfere in the health of these animals and in many cases have been associated with their

mortality (Buergelt *et al.*, 1984; Beck & Forrester, 1988). So far, about 25 species of helminth parasites have been reported as infecting manatees (Mignucci-Giannoni *et al.*, 1999b; Lieven *et al.*, 2011; Bando *et al.*, 2014), however, only in few of these cases clinical signs are associated with the parasitic infection (Beck & Forrester, 1988; Bossart, 2001).

From 1991 to 2003, a large copromicroscopic survey using different techniques (i.e., direct methods, flotation and sedimentation) was conducted in Brazil, which showed that all manatees studied were negative for the presence of helminthes (Borges *et al.*, 2004). On the other hand, a research study carried out in the state of Ceará in 2009, detected *Pulmonicola cochleotrema* in the upper respiratory tract of free-living specimens (Carvalho *et al.*, 2009).

Therefore, in order to bridge the gap on the knowledge of helminth fauna in sirenian species, the aim of this study was to assess the frequency of infection by *P. cochleotrema* in Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*), in the Northeast region of Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Between the years of 1989 and 2014, 88 manatees were studied, 39 specimens representing stranded animals found dead, rescued between the states of Sergipe (11° 25' 32 S and 37° 19' 18 W) and Rio Grande do Norte (04° 49' 55 S and 37° 15' 09 W). The carcasses of dead animals were necropsied (Vergara-Parente, 2005) and careful examinations of the respiratory and digestive systems was performed (Marigo & Andrade, 2005).

In addition, considering the actions planned for the strategy of manatee conservation in Brazil (Icmbio, 2011), 49 specimens were monitored; some of them during their rehabilitation process and maintenance in pools (n = 23), some during the rehabilitation period in captivity, built in the natural environment (n = 5), and others after reintroduction (n = 21).

All animals in captivity and those reintroduced were physically examined and fecal samples were collected for laboratorial analyses. The age of animals were estimated based on data previously published on Florida and Antillean manatees (Marmontel, 1993; Borges *et al.*, 2012). It is important to note that during physical examination, three reintroduced animals eliminated parasites from their nostrils during breathing.

All fecal samples and helminthes collected were fixed and preserved in a solution containing alcohol, formalin, glacial acetic acid and distilled water. Afterwards, the fecal material was analyzed through sedimentation and flotation techniques (Bando *et al.*, 2014) and helminthes were clarified in lactophenol, stained and mounted on microscope slides for morphological identification (Amato, 1985). Parasites were measured and identified using previous descriptions (Blair, 1981; Blair, 2005; Carvalho *et al.*, 2009).

In order to investigate the interaction between infection by *P. cochleotrema* and gender (male or female) and/or age (puppy, young or adult) the log-linear method was used (Quinn & Keough, 2002). All analyzes were performed by the glm() function of the MASS package (Venables & Ripley, 2002) of Software R (R Core Team, 2014).

All procedures herein performed were approved by the *Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO)* (license number: 33.819-1) and by the Ethics Committee of Animal Experimentation (ECAE) of the *Universidade Federal Rural de Pernambuco* (license number: 010/2014).

RESULTS

Out of 88 animals analyzed, 7.95% (7/88) scored positive for the presence of *P. cochleotrema* in the nostrils (Figure 1), trachea and/or bronchi. The trematodes herein found presented oval bodies with 6.6 mm in length and 4.83 mm in width. Morphologically they were concave ventrally and convex dorsally. In addition, they presented an oral sucker subterminal with transversal opening, branched intestinal cecum and multilobated and irregular ovaries. Testicles were rounded, multilobulated, and located in the posterior third of the body. All trematodes were identified as *P. cochleotrema* (Digenea: Opisthotrematidae).

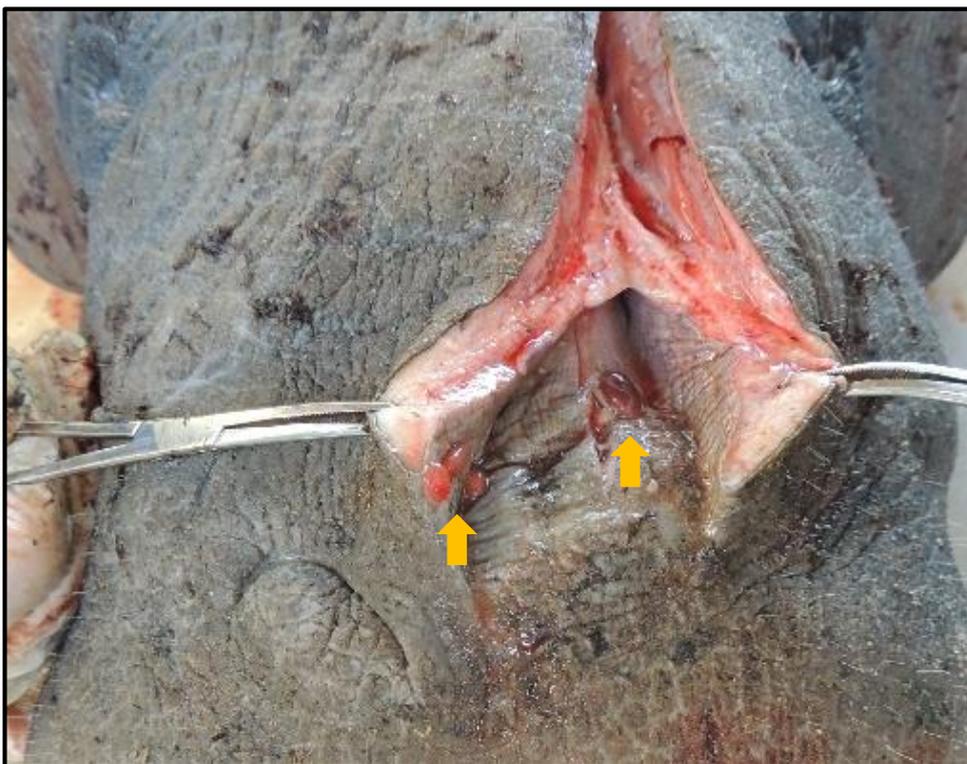


Fig. 1. *Pulmonicola cochleotrema* (Digenea: Opisthotrematidae) found in the nostril of Antillean manatee

Although a higher frequency of infection was observed in females (71.42%; 05/07), this gender did not present any correlation with the occurrence of the parasite ($g1 = 1$; $F = 0$; $p = 1$). Conversely, age was correlated with the occurrence of infection by *P. cochleotrema* ($g1 = 2$; $F = 4.6193$; $p < 0.001$), because all positive animals were adults. On the other hand, no correlation between the positivity and gender/age was observed.

It is important to note that the frequency of infection in dead and live animals were 10.25% (04/39) and 6.12% (03/49), respectively. Positive results were obtained only in free-living animals, including native and reintroduced species. No parasites were detected in animals maintained in captivity.

In three reintroduced specimens (6.12%; 3/49), respiratory changes (i.e., atypical noises and nasal mucous secretion) were observed. In addition, clinical signs suggestive of bronchitis and bronchopneumonia were reported. Some specimens eliminated parasites from the nostrils during breathing. All clinical signs herein reported are compatible with infection by *P. cochleotrema*.

All analyses of feces scored negative for the presence of eggs or larvae.

DISCUSSION

The frequency of infection by *P. cochleotrema* observed in the present research study (i.e., 7.95%) was lower than that reported in a previous study in United States, where a positivity of 38% was detected (Beck & Forrester, 1988), and in Porto Rico (Mignnuci-Giannoni *et al.*, 1999a) where 26% of manatees were parasitized by this trematode. Similarly, a study conducted in the state of Ceará, Brazil, reported a positivity of 26.7% (Carvalho *et al.*, 2009).

The findings of this study are relevant and expand the knowledge on the occurrence area (states of Paraíba and Sergipe) of *P. cochleotrema* in Antillean manatees in Brazil.

Special attention has been given to the factors that contributed to the occurrence of *P. cochleotrema* in manatees in the last years. Until 2013, no infection had been reported in Antillean manatees (free-living animals or in captivity) in the states of Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba and Rio Grande do Norte. In addition, during a large copromicroscopic survey conducted from 1991 to 2003, and during the examination of manatee carcasses (Borges *et al.*, 2004), no trematode species were detected.

In order to better understand the epidemiological factors associated with the infection by *P. cochleotrema* in sirenian species, as well as the host-parasite relationship, it is pivotal to know the biology of this trematode. Indeed, until now, information about its life cycle in manatees, as

well as factors influencing its survival in environmental conditions and routes of infection remain unknown (Beck & Forrester, 1988).

In fact, it is believed that *P. cochleotrema* can use mollusks or crustaceans as intermediate hosts (Beck & Forrester, 1988). These invertebrates are found attached to algae and seagrasses, which are important sources of food for manatees (Borges *et al.*, 2008). Therefore, it is likely that the infection occurs after ingestion of these vegetables (Blair, 1981; Beck & Forrester, 1988; Bando *et al.*, 2014).

It has been proved in other studies that environmental factors such as salinity and water temperature can influence the occurrence of *P. cochleotrema* (Beck & Forrester, 1988). Consequently, changes of these water parameters as a result of anthropogenic impacts on estuarine environments (e.g., reduction of mangroves, release of waste from farming activities, effluents without sanitary treatment), may interfere directly in the biology of this trematode (Paludo & Klonowski, 1999; Mourão & Nordi, 2003; Pereira, 2004; Silvestre *et al.*, 2011).

It is important to highlight that infection by *P. cochleotrema* was observed only in native and reintroduced species. Therefore, it is likely that intrinsic factors related to the condition of free-living animals may play an important role in the susceptibility to infection of the Antillean manatees herein studied. Moreover, it has been demonstrated that manatees living in the Florida Peninsula were more exposed to the infection due to their displacements and consequent diversity of food resources ingested by them (Bando *et al.*, 2014). In Brazil, this sirenian species may also move over a large area, which makes them vulnerable to infection by these parasites (Lima *et al.*, 2012; Normande *et al.*, 2014).

Most likely, the lack of infections by this trematode in animals maintained in captivity, especially in pools with physical and chemical water treatment, occurs due to the absence of intermediate hosts.

Only adult animals were found infected with *P. cochleotrema*. This finding is similar to another study previously reported, in which only older animals were affected, probably because these animals use a large area of habitat during their life-time (Beck & Forrester, 1988).

The presence of atypical noises and nasal mucous secretion in animals naturally infected by *P. cochleotrema* has already been reported (Beck & Forrester, 1988; Mignucci-Giannoni *et al.*, 1999a). In fact, clinical signs related to the infection by this trematode are seldom recorded (Bossart, 2001), but when they occur the animal may present chronic rhinitis, pulmonary edema, pneumonia, and in some cases death (Beck & Forrester, 1988).

The absence of helminthes eggs and larvae in the feces herein analyzed is similar to the findings previously reported by Borges *et al.* (2004). Therefore, it is important to adopt new tools with higher sensitivity in order to improve diagnoses of parasite infections.

In conclusion, the displacement ability of Antillean manatees along the Brazilian coast might be an important factor for the spreading of *P. cochleotrema*. In addition, it is important to note that this is the first report of manatees infection by this trematode in the states of Paraíba and Sergipe.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors kindly thank all the staff of the *Fundação Mamíferos Aquáticos* and of the *Centro Mamíferos Aquáticos/ICMBio*, as well as of *Projeto Viva o Peixe-Boi Marinho*, who were important during the rescue, rehabilitation and reintroduction activities of the manatees used in this study. In addition, authors would like to thank CAPES for their financial support.

REFERENCES

- Alves M.D.O., Schwamborn R., Borges J.C.G., Marmontel M., Costa A.F.C., Schettini C.A.F. and Araújo M.E.** (2013) Aerial survey of manatees, dolphins and sea turtles off northeastern Brazil. *Biological Conservation* 161, 91-100.
- Amato J.F.** (1985) *Manual de técnicas para a preparação de coleções zoológicas. 8. Platelminhos (temnocefálicos, trematódeos, cestóides, cestodários) e acantocéfalos.* São Paulo: Sociedade Brasileira de Zoológicos.
- Bando M., Larkin I.V., Wright S.D. and Greiner E.C.** (2014) Diagnostic stages of the parasites of the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*. *Journal of Parasitology* 100, 133-138.
- Beck C. and Forrester D.J.** (1988) Helminths of the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*, with a discussion and summary of the parasites of Sirenians. *Journal of Parasitology* 74, 628-637.
- Blair D.** (1981) The Monostome Flukes (Digenea: Families Opisthotrematidae Poche and Rhabdiopoeidae Poche) Parasitic in Sirenians (Mammalia: Sirenia). *Australian Journal of Zoology Supplementary Series* 81, 1-54.

- Blair D.** (2005) Family Opisthotrematidae Poche, 1926. In Jones A., Bray R.A., Gibson D.I. (eds) *Keys to Trematoda*. London, UK: CABI International and The Natural History Museum, pp 401-406.
- Bonde R.K., Aguirre A. and Powell J.** (2004) Manatees as sentinels of marine ecosystem health: are they the 2000-pound canaries? *EcoHealth* 1, 255-262.
- Borges J.C.G., Alves L.C., Faustino M.A.G. and Marmontel M.** (2011) Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Antillean manatees (*Trichechus manatus*) and Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*) from Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 42, 593-596.
- Borges J.C.G., Araújo P.G., Anzolin D.G. and Miranda G.E.C.** (2008) Identificação de itens alimentares constituintes da dieta dos peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) na região Nordeste do Brasil. *Biotemas* 21, 77-81.
- Borges J.C.G., Freire A.C.B., Attademo F.L.N., Serrano I.L., Anzolin D.G., Carvalho P.S.M. and Vergara-Parente J.E.** (2012) Growth pattern differences of captive born Antillean manatee (*Trichechus manatus*) calves and those rescued in the Brazilian Northeastern Coast. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43, 494-500.
- Borges J.C.G., Vergara-Parente J.E., Alvite C.M.C., Marcondes M.C.C. and Lima R.P.** (2007) Embarcações motorizadas: uma ameaça aos peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) no Brasil. *Biota Neotropica* 7, 199-204.
- Borges J.C.G., Vergara-Parente J.E., Lima R.P., Brito F.L.C. and Alves L.C.** (2004) Helminthose gastrointestinal em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*), no Brasil. In: *11ª Reunión de Especialistas em Mamíferos Acuáticos de América del Sur*, Quito.
- Bossart G.D.** (2001) Manatees. In Dierauf L.A., Gulland F.M.D. (eds) *CRC handbook of marine mammal medicine*. Florida, EUA: CRC Press, pp. 939-958.
- Buergelt C.D., Bonde R.K., Beck C.A. and O'Shea T.J.** (1984) Pathologic findings in manatees in Florida. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 185, 1331-1334.
- Carvalho V.L., Meirelles A.C.O., Motta M.R.A., Maia D.C.B.S.C., Campello M.V.M. and Bevilaqua C.M.L.** (2009) Occurrence of *Pulmonicola cochleotrema* (Syn. *Cochleotrema*

- cochleotrema*) (Digenea: Opisthotrematidae) in Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*) in Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Mammals* 7, 47-52.
- Domning D.P.** (1982) Comercial exploitation of manatees *Trichechus* in Brazil. 1785-1973. *Biological Conservation* 22, 101-126.
- Ghim S., Joh J., Mignucci-Giannoni A.A., Rivera-Guzmán A.L., Falcón-Matos L., Alsina-Guerrero M.M., Rodríguez-Villanueva M., Jenson A.B. and Bossart G.D.** (2014) Genital Papillomatosis Associated with Two Novel Mucosotropic Papillomaviruses from a Florida Manatee (*Trichechus manatus latirostris*). *Aquatic Mammals* 40, 189-194.
- Icmbio.** (2011) Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Sirênios: peixe-boi-da-Amazônia: *Trichechus inunguis* e peixe-boi marinho: *Trichechus manatus*. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.
- Iucn.** (2014) Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>.
- Lieven A.F.V., Uni S., Ueda K., Barbuto M. and Bain O.** (2011) *Cutidiplogaster manati* n. gen., n. sp. (Nematoda: Diplogastridae) from skin lesions of a West Indian manatees (Sirenia) from the Okinawa Churaumi Aquarium. *Nematology* 13, 51-59.
- Lima R.P., Alvite C.M.C., Reid J.P. and Júnior A.B.** (2012) Distribuição espacial e temporal de peixes-bois (*Trichechus manatus*) reintroduzidos no litoral nordeste do Brasil. *Natural Resources* 2, 63-80.
- Lima R.P., Paludo D., Soavinski R.J., Silva K.G. and Oliveira E.M.** (2011) Levantamento da distribuição, ocorrência e *status* de conservação do Peixe-Boi Marinho (*Trichechus manatus*, Linnaeus, 1758) no litoral nordeste do Brasil. *Natural Resources* 1, 41-57.
- Luna F.O., Lima R.P., Araújo J.P. and Passavante J.Z.O.** (2008) *Status* de conservação do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*, Linnaeus, 1758) no Brasil. *Revista Brasileira de Zoociências* 10, 145-153.
- Marigo J. and Andrade A.L.V.** (2005) Parasitologia. In Vergara-Parente J.E. (ed) *Protocolo de conduta para encalhes de mamíferos aquáticos*. Pernambuco: Ibama Press, pp. 280-290.

- Marmontel M.** (1993) *Age determination and population biology of the Florida manatee, Trichechus manatus latirostris*. Dissertation, University of Florida, Florida, EUA.
- Meirelles A.C.O.** (2008) Mortality of the antillean manatee, *Trichechus manatus manatus*, in Ceará State, North-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88, 1133-1137.
- Mignucci-Giannoni A.A., Beck C.A., Montoya-Ospina R.A. and Williams E.H.** (1999b) Parasites and Commensals of the West Indian Manatee from Puerto Rico. *Journal of Helminthology* 66, 67-69.
- Mignucci-Giannoni A.A., Williams, E.H., Toyos-González G.M., Pérez-Padilla J., Rodríguez-López M.A., Veja-Guerra M.B. and Ventura-González M.** (1999a) Helminths from a stranded manatee in the Dominican Republic. *Veterinary Parasitology* 81, 69-71.
- Mma.** (2014) Portaria N° 444, de 17 de dezembro de 2014. *Diário Oficial da União*, 245, 121-122.
- Mourão J.S. and Nordi N.** (2003) Etnoictiologia de pescadores artesanais do estuário do Rio Mamanguape, Paraíba, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca* 29, 9-17.
- Nishida A.K., Nordi N. and Alves R.R.N.** (2008) Aspectos socioeconômicos dos catadores de moluscos do litoral paraibano, Nordeste do Brasil. *Revista de Biologia e Ciência da Terra* 8, 207-215.
- Normande I.C., Luna F.O., Malhado A.C.M., Borges J.C.G., Junior P.C.V., Attademo F.L.N. and Ladle R.J.** (2014) Eighteen years of Antillean manatee *Trichechus manatus manatus* releases in Brazil: lessons learnt. *Fauna & Flora International Oryx* 49, 1-7.
- Paludo D. and Klonowski V.S.** (1999) *Barra de Mamanguape-PB: Estudo do impacto do uso de madeira de manguezal pela população extrativista e da possibilidade de reflorestamento e manejo dos recursos madeireiros*. São Paulo: Série Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica.
- Parente C.L., Vergara-Parente J.E. and Lima R.P.** (2004) Strandings of Antillean manatees, *Trichechus manatus manatus*, in Northeastern Brazil. *Latin American Journal Aquatic Mammals* 3, 69-75.

- Pereira R.S.** (2004) Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hidricos. *Revista Eletrônica de Recursos Hídricos* 1, 20-36.
- Quinn G.P. and Keough M.J.** (2002) *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. New York: Cambridge University Press.
- R Core Team.** (2014) *R: A language and environment for statistical computing*. <http://www.r-project.org/>.
- Silvestre L.C., Farias D.L.S., Lourenço J.D.S., Barros S.C.A. and Braga N.M.P.** (2011) Diagnóstico dos impactos ambientais advindo de atividades antrópicas na APA da Barra do Rio Mamanguape. *Revista Enciclopédia Biosfera* 7, 1-11.
- Venables W.N. and Ripley B.D.** (2002) *Modern Applied Statistics with S*. 4th edition. New York: Springer.
- Vergara-Parente J.E.** (2005) Necropsia de Sirênios. In Vergara-Parente J.E. (ed) *Protocolo de conduta para encalhes de mamíferos aquáticos*. Recife, Brasil: Ibama, pp. 185-203.
- Vergara-Parente J.E., Sidrim J.J.C., Teixeira M.F.S., Marcondes M.C.C. and Rocha M.F.G.** (2003) Salmonellosis in an Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) calf: a fatal case. *Aquatic Mammals*. 29, 131-136.

5. CAPÍTULO II

**Treatment of *Pulmonicola cochleotrema* infection with ivermectin-praziquantel combination in Antillean manatees
(*Trichechus manatus manatus*)**

Capítulo estruturado em formato de artigo e submetido para o periódico *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*.

5. TREATMENT OF *PULMONICOLA COCHLEOTREMA* INFECTION WITH IVERMECTIN-PRAZIQUANTEL COMBINATION IN ANTILLEAN MANATEES (*TRICHECHUS MANATUS MANATUS*)

Abstract

Although manatees have been considered animals that are resistant to various diseases, in some cases the presence of certain pathogens might cause important clinical and pathological manifestations. The aim of this study was to report for the first time the use of an oral combination of ivermectin plus praziquantel in the treatment of *Pulmonicola cochleotrema* in Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*). In May 2014, a ten-year-old female manatee, reintroduced into the Mamanguape River in the state of Paraíba, Brazil, was found exhibiting respiratory changes and the presence of parasites in the nostrils. The animal was physically examined and parasites were collected for subsequent identification. Based on the clinical manifestations presented by the manatee, a symptomatic therapeutic protocol was employed; in addition, the anthelmintic treatment was performed using a combination of ivermectin plus praziquantel. The parasites retrieved were identified as *P. cochleotrema*. From the fourth day after the onset of the therapeutic protocol, the clinical signs declined and on the seventh day post-treatment no clinical signs were observed. This present study reports infection by this trematode species, associated with clinical manifestations in sirenians from Brazil. In addition, for the first time, a therapeutic protocol based on ivermectin plus praziquantel was used in the treatment of *P. cochleotrema* in manatees.

Keywords: Conservation, clinical signs, helminthes, aquatic mammals, sirenians, trematode.

The sirenians are aquatic herbivorous mammals represented by the dugong (*Dugong dugon*), West African manatee (*Trichechus senegalensis*), Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*) and the West Indian manatee (*Trichechus manatus*).⁹ The West Indian manatee has been tentatively divided into two subspecies: The Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) and the Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*).⁷

Although these animal species have been considered resistant to various diseases, they have been frequently reported as being infected by some parasites.^{3,5} However, in most cases clinical signs have not been observed,^{3,11} which complicates the understanding of the pathological disorders that occur, as well as the therapeutic protocols to be adopted. Therefore, the aim of this

study was to report the use of ivermectin plus praziquantel in the treatment of infection by *Pulmonicola cochleotrema* in Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*) for the first time.

An adult Antillean manatee female with 274 kg of body weight and measuring 242 centimeters was herein studied. In 2008 the animal was reintroduced into the estuary of the Mamanguape River (6° 45' 00.29" S and 34° 55' 51.32 W), located in the state of Paraíba, on the Northeastern coast of Brazil.

After reintroduction, the animal was monitored by the UHF/VHF¹³ system, and in May 2014, respiratory changes characterized by atypical noises and nasal mucous secretion were observed (Fig. 1). According to the monitors who followed the animal's displacements, these clinical signs were present for at least two months. In two occasions the animal eliminated parasites from the nostrils during breathing, which were collected for subsequent identification.



Figure 1: Presence of nasal mucous secretion in an Antillean manatee

This animal was captured, physically examined, measured and weighed. In addition, whole blood, fecal samples and nasal swab were collected. These procedures were repeated every 12 days, over a two month period.

Helminths and fecal samples were fixed and preserved in a solution of alcohol, glacial acetic acid and distilled water. Subsequently, the parasites were stained and mounted on slides for morphological identification by optical microscopy.^{4,6} Feces were analyzed through sedimentation and flotation techniques.² Blood samples were put in sterile tubes with and without anticoagulant (10% Ethylenediamine tetracetic acid) for the blood cell count and serum biochemistry analyses.^{8,15}

Based on the clinical signs and the presence of parasites in the nostril, an anthelmintic treatment with ivermectin plus praziquantel (200 mg/kg/PO) was performed. In addition, the animal was treated with antibiotics (enrofloxacin 5 mg/kg/PO/SID), mucolytic bronchodilator

(Clenbuterol hydrochloride plus Acetylcysteine (0.04 ml/Kg/PO/SID) and food supplements (vitamin and mineral) for 20 days. During the whole treatment period, the animal was evaluated daily without physical restraint.

The parasites eliminated during the animal breathing were morphologically identified as digenetic trematodes belonging to the Opisthorematidae family, and the *P. cochleotrema* species.^{4,6}

The fecal samples analyzed did not show the presence of eggs or larvae of helminths. On the other hand, the blood cell count revealed a slight leukopenia, and the nasal swab performed scored negative.

The clinical signs of bronchitis and pneumonia herein observed were similar to those presented during infections by *P. cochleotrema*. It is important to note that after the fourth day post-treatment, the respiratory difficulties reduced, and were inexistent after the seventh day of treatment. Although few studies have described clinical signs associated with infection by *P. cochleotrema* in manatees, the findings of this study (i.e., respiratory changes and dehydration) are similar to those observed in another study of a specimen from the Dominican Republic.¹²

According to the degree of infection by *P. cochleotrema*, animals can be asymptomatic or present respiratory changes caused by chronic rhinitis, pulmonary edema and pneumonia, which can lead to death when untreated.⁴ Indeed, cases of massive infection by this trematode species can cause weakness in the host, making it extremely vulnerable to infection by other pathogens, traumas and inapetency.²

Manatees are considered one of the most endangered aquatic mammals in Brazil, currently presenting low population densities.¹ Therefore, all efforts to conserve each specimen are pivotal.

Over the last years it has been speculated that drugs used to treat wild animals may represent a risk to other non-target organisms as well as the ecosystem.^{10,14} Therefore, the choice of the therapeutic protocol herein used was based on previous reports of infection by trematodes involving sirenians.^{3,11,12} At the end of the study, the animal did not present any clinical signs, rendering the treatment protocol successful.

Finally, in order to better understand the relationship between *P. cochleotrema* and other parasitic agents affecting manatees, it is important to adopt specific programs to better monitor the health conditions of these animals.

LITERATURE CITED

1. Alves MDO, Kinas PG, Marmontel M, Borges JCG, Costa AF, Schiel N, Araújo ME. First abundance estimate of the Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) in Brazil by aerial survey. JMBA. 2015;1-15.
2. Bando M, Larkin IV, Wright SD, Greiner EC. Diagnostic stages of the parasites of the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*. J Parasitol. 2014;100:133-138.
3. Beck C, Forrester DJ. Helminths of the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*, with a discussion and summary of the parasites of Sirenians. J Parasitol. 1988;74:628-637.
4. Blair D. The Monostome Flukes (Digenea: Families Opisthotrematidae Poche and Rhabdiopoeidae Poche) Parasitic in Sirenians (Mammalia: Sirenia). Aust J Zool Suppl Ser. 1981;81:1-54.
5. Borges JCG, Alves LC, Faustino MAG, Marmontel M. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Antillean manatees (*Trichechus manatus*) and Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*) from Brazil. J Zoo Wildl Med. 2011;42:593-596.
6. Carvalho VL, Meirelles ACO, Motta MRA, Maia DCBSC, Campello MVM, Bevilaqua CML. Occurrence of *Pulmonicola cochleotrema* (Syn. *Cochleotrema cochleotrema*) (Digenea: Opisthotrematidae) in Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*) in Brazil. Lat Am J Aquat Mamm. 2009;7:47-52.
7. Domning DP, Hayek L. Interspecific and intraspecific morphological variation in manatees (Sirenia: Trichechidae). Mar Mamm Sci. 1986;2: 87-141.

8. Harvey JW, Harr KE, Murphy D, Walsh MT, Nolan EC, Bonde RK, Pate MG, Deutsch CJ, Edwards H, Clapp WL. Hematology of healthy Florida manatees (*Trichechus manatus*). Vet Clin Pathol. 2009;38(2):183-193.
9. Hines EM, Reynolds III JE, Aragonés LV, Mignucci-Giannoni AA, Marmontel M. Sirenian Conservation. Issues and Strategies in Developing Countries. University Press of Florida. 2012. 326 p.
10. Hutchins M, Foose T, Seal US. The role of veterinary medicine in endangered species conservation. J Zoo Wildl Med. 1991;22: 277-281
11. Mignucci-Giannoni AA, Beck CA, Williams EH. Parasites and Commensals of the West Indian Manatee from Puerto Rico. J Helminthol. 1999;66:67-69.
12. Mignucci-Giannoni AA, Williams, EH, Toyos-González GM, Pérez-Padilla J, Rodríguez-López MA, Veja-Guerra MB, Ventura-González M. Helminths from a stranded manatee in the Dominican Republic. Vet Parasitol. 1999;81:69-71.
13. Normande IC, Luna FO, Malhado ACM, Borges JCG, Junior PCV, Attademo FLN, Ladle RJ. Eighteen years of Antillean manatee *Trichechus manatus manatus* releases in Brazil: lessons learnt. Oryx. 2014;49:1-7.
14. Pizzi R. Veterinarians and Taxonomic Chauvinism: The Dilemma of Parasite Conservation. J Exot Pet Med. 2009;18:279-282.
15. Silva FMO, Vergara-Parente, JE, Teixeira, MN, Lima RP. A contribution for the definition of serum chemistry values in captive adults Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758). J Vet Med A. 2007;54: 119-122.

6. CAPÍTULO III

***Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em lontra neotropical (*Lontra longicaudis*)
e ariranha (*Pteronura brasiliensis*) na região Norte
do Brasil**

Capítulo estruturado em formato de artigo e será submetido para o periódico *Parasitology Research*.

6. *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em lontra neotropical (*Lontra longicaudis*) e ariranha (*Pteronura brasiliensis*) na região Norte do Brasil

Resumo

A avaliação da ocorrência de doenças em mustelídeos aquáticos é uma ação prioritária na estratégia de conservação da lontra neotropical e ariranha. Em face a isto, este trabalho teve como objetivo determinar a frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em lontra neotropical e ariranha na região Norte do Brasil. A coleta do material biológico ocorreu nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia, totalizando 337 amostras fecais destas espécies, as quais foram submetidas ao processamento utilizando a técnica de Kinyoun para a identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e a centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco para a visualização dos cistos de *Giardia* sp. Todas as amostras foram submetidas ao teste de imunofluorescência direta. A frequência da infecção foi maior por *Cryptosporidium* spp. do que ocasionada por *Giardia* sp., tanto em lontras como em ariranhas. Nas amostras analisadas foi constatada co-infecção por ambos os protozoários estudados, sendo que estes eventos representaram 4,47% (14/313) das ocasiões envolvendo as lontras e 20,83% (05/24) inerentes às ariranhas. A identificação de lontra neotropical e ariranha como hospedeiros de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp., aliado à capacidade dos oocistos e cistos respectivamente destes protozoários permanecerem infectantes em condições ambientais por um longo período de tempo, amplia a possibilidade de transmissão destes agentes para outros organismos aquáticos, terrestres e populações humanas. Os achados deste trabalho, constituem a primeira descrição de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. acometendo *Lontra longicaudis* e *Pteronura brasiliensis*.

Palavras-Chave: Doenças parasitárias, protozoários, zoonoses, mamíferos aquáticos, mustelídeos.

Abstract

Evaluating the occurrence of diseases in aquatic mustelidae is a priority in the conservation strategies for the neotropical otter and the giant otter. Thus, the objective of this study was to determine the frequency of infection caused by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* sp. in the neotropical and giant otters in northern Brazil. The collection of biological material was carried out in the states of Amapá, Amazonas, Pará and Rondônia, totaling 337 fecal samples of these species, which were submitted to processing using Kinyoun technique for the identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts, and to centrifugal flotation in zinc sulphate solution for

visualization of *Giardia* sp. cysts. All samples were subjected to the direct immunofluorescence test. The frequency of infection by *Cryptosporidium* spp. was higher than *Giardia* sp., both in neotropical otters and giant otters. In the analyzed samples co-infection of both protozoa were also found, these cases being represented by 4.47% (14/313) of occasions involving neotropical otters and 20.83% (5/24) involving giant otters. After having identified the neotropical and giant otters as hosts of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* sp., it became evident that the ability of the oocysts and cysts of these protozoa, respectively, to remain infectious within specific environmental conditions for long periods of time, increases the possibility of transmission of these agents to other aquatic and terrestrial organisms, as well as to human populations. The findings of this study are the first description of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* sp. affecting *Lontra longicaudis* and *Pteronura brasiliensis*.

Keywords: Parasitic diseases, protozoa, zoonoses, aquatic mammals, mustelidae.

Introdução

Dentre os mamíferos aquáticos com ocorrência nos sistemas fluviais da Amazônia brasileira, estão duas espécies de mustelídeos, a lontra neotropical (*Lontra longicaudis*) e a ariranha (*Pteronura brasiliensis*) (Carter e Rosas 1997; Coletti et al. 2013). Os principais habitats destas espécies são os rios, lagos, igarapés e áreas alagadas, com margens disponíveis e vegetação presente (Coletti et al. 2013; Lima et al. 2013; Palmeirim et al. 2014), baixos níveis de poluição e pouca ocupação humana, apesar de tolerarem ambientes antropizados (Palmeirim et al. 2014).

Atualmente, a alteração de habitats decorrente da ocupação humana e a exploração dos recursos naturais em florestas tropicais constituem ameaças a estes animais (Carter e Rosas 1997; Coletti et al. 2013), assim como o trânsito de embarcações, poluição e contaminação dos recursos hídricos (Carter e Rosas 1997). Adicionalmente, estas espécies são ainda ameaçadas por drenagem de áreas alagadas para práticas de agricultura, exploração mineral e de combustíveis fósseis (Palmeirim et al. 2014).

Os diversos fatores de natureza antropogênica associados aos impactos nos recursos hídricos e terrestres utilizados pelas lontras e ariranhas, bem como a possibilidade destas espécies co-habitarem locais com ocorrência de outros animais domésticos e silvestres, ampliam a vulnerabilidade destes mustelídeos a infecções ocasionadas por *Cryptosporidium* e *Giardia* (Gaydos et al. 2007).

Em decorrência da disseminação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* sp. nos recursos hídricos (Fayer et al. 2004; Lasek-Nesselquist et al. 2008), as ocorrências das infecções por estes agentes etiológicos têm sido relatadas em sirênios (Morgan et al. 2000; Borges

et al. 2011), pinípedes (Rengifo-Herrera et al. 2011), cetáceos (Hughes-Hanks et al. 2005) e mustelídeos (Gaydos et al. 2007; Méndez-Hermida et al. 2007).

A investigação de doenças em mustelídeos aquáticos é uma ação prioritária na estratégia de conservação deste grupo taxonômico (Gaydos et al. 2007), pois pouco se sabe sobre os agentes etiológicos que os acometem. Estudos desta natureza, considerando a capacidade que as lontras e ariranhas apresentam de atuar como sentinelas da qualidade ambiental, possibilitam sinalizar a condição dos recursos hídricos, os possíveis riscos para outras espécies que utilizam os mesmos habitats (Bonde et al. 2004), ou ainda, para as populações humanas (Xiao et al. 2002; Appelbee et al. 2010; Wagnerová et al. 2015)

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi determinar a frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em lontra neotropical (*Lontra longicaudis*) e ariranha (*Pteronura brasiliensis*) na região Norte do Brasil.

Material e Métodos

Áreas de Estudo

As atividades de coleta ocorreram nos estados do Amapá (rio Jari), Amazonas (lago Amanã e lago Tefé), Pará (igarapés Araticum e Saracá, lago Sapucuá e rio Tapajós) e Rondônia (rio Madeira). Estas localidades estão inseridas no Bioma Amazônico, composto por grandes extensões de floresta tropical, com áreas inundáveis de várzea, igapó e florestas de terra-firme (Ayres et al. 2005).

Ao longo destas áreas, em determinadas localidades, encontram-se grandes extensões conservadas, baixa densidade demográfica e alta riqueza de espécies animais e vegetais (Ayres et al. 2005; Lima 2009), assim como a presença de atividades agropecuárias, ocorrência de animais domésticos nos núcleos urbanos, represamento de rios em função da construção de hidrelétricas (Junk e Melo 1990) e atividades de extração de minérios (Monteiro 2005).

Nestes locais, ocorre uma variação sazonal no nível da água que influencia os ecossistemas aquáticos (Junk et al. 1989), de forma que os períodos de enchente e cheia acontecem, geralmente, entre novembro e junho, enquanto vazante e seca ocorrem entre o final de junho e início de novembro (Ayres 1993; Lima 2009).

Coleta de Amostras Biológicas

De 2011 a 2014 foram coletadas 337 amostras fecais, sendo 313 provenientes de lontras neotropicais e 24 de ariranhas (Tabela 1). Ao longo das incursões náuticas realizadas nas áreas de

estudo, as amostras biológicas coletadas foram encontradas em sítios de defecação e próximas a abrigos. As atividades ocorreram nos períodos de cheia (estação chuvosa) e seco (estação seca).

Tabela 1: Procedência das amostras fecais provenientes das lontras e ariranhas

Espécie	Estados/Número de Amostras				Total
	Pará	Amapá	Rondônia	Amazonas	
Lontra neotropical	33	230	38	12	313
Ariranha	6	8	9	1	24
Total	39	238	47	13	337

Após a coleta, o material foi acondicionado em frascos contendo solução constituída de álcool, formol, ácido acético glacial e água destilada (AFA), em proporções sugeridas por Ueno e Gonçalves (1994), sendo estas devidamente identificadas e encaminhadas para posterior processamento laboratorial.

Processamento Laboratorial

Uma parte das amostras obtidas foi submetida à sedimentação pelo formol-éter com posterior confecção dos esfregaços e coloração por meio da técnica de Kinyoun (Brasil 1996), para a identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. Ao que concerne à pesquisa de cistos de *Giardia* sp., as amostras coletadas foram analisadas por meio da técnica de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (Gaydos et al. 2007; Bica et al. 2011). Posteriormente, outra parte da amostra foi submetida ao teste de imunofluorescência direta, conforme as recomendações do Kit Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*, sendo os oocistos e cistos identificados com base em sua forma, tamanho e o padrão da intensidade da imunofluorescência (Reboredo-Fernández et al. 2015).

As amostras foram consideradas positivas quando um dos testes utilizados permitiu a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* sp. (Borges et al. 2011; Rengifo-Herrera et al. 2011).

Análises dos dados

Para avaliar a associação entre as espécies investigadas neste estudo e as variáveis, procedência (local de origem das amostras), infecção por *Cryptosporidium* spp. e por *Giardia* sp. e sazonalidade (período chuvoso e seco), foram executados testes de qui-quadrado. Porém, quando as frequências esperadas foram menores que cinco em mais de 20% do respectivo conjunto de

dados, optou-se pelo Teste de Fisher (Quinn e Keough 2002; Crawley 2013). As análises foram executadas utilizando o Software R (R Core Team 2014).

Resultados

Considerando o número total de amostras provenientes das lontras e ariranhas, a frequência da infecção ocasionada por *Cryptosporidium* sp. foi de 17,21% (58/337), enquanto que a presença de *Giardia* sp. foi observada em 10,68% (36/337).

Com base nestes achados pode-se constatar que a frequência da infecção foi maior por *Cryptosporidium* spp. do que ocasionada por *Giardia* sp., tanto em lontras neotropicais como em ariranhas (Tabela 2). Nas amostras analisadas, foram constatados os casos de co-infecção.

Tabela 2: Frequência absoluta (FA) e relativa (FR) de infecção por *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e co-infecção em lontras e ariranhas, utilizando as técnicas de Kinyoun, centrífugo-flutuação e imunofluorescência direta.

Espécie	N° Amostras	<i>Cryptosporidium</i> spp.		<i>Giardia</i> sp.		Co-infecção	
		FA	FR (%)	FA	FR (%)	FA	FR (%)
Lontra neotropical	313	48	15,33	29	9,26	14	4,47
Ariranha	24	10	41,66	7	29,16	5	20,83

Testando a associação entre a presença de *Cryptosporidium* spp. e a ocorrência de *Giardia* sp. Em lontras, houve uma associação entre essas duas variáveis ($\chi^2 = 30,708$; gl = 1; $p < 0,00001$), porém o mesmo não foi observado em ariranhas ($p = 0,08501$).

Em lontras neotropicais, a infecção por *Cryptosporidium* spp. foi maior durante a estação chuvosa (22,8%), do que na época da seca (12,21%), sendo constatada a associação do referido protozoário ao período chuvoso ($\chi^2 = 5,6309$; gl = 1; $p = 0,01765$). Neste mustelídeo, apesar da ocorrência de *Giardia* sp. ter sido maior no período chuvoso (13,04%) ao comparar com o período seco (8,16%), não houve uma diferença significativa ($\chi^2 = 1,79877$; gl = 1; $p = 0,179861$) em relação à sazonalidade climática.

Nas ariranhas, a presença das infecções por *Cryptosporidium* spp. ($p = 0,2391$) e *Giardia* sp. ($p = 0,5296$) ocorreram de forma independente da estação climática.

Os resultados não evidenciaram qualquer associação entre as áreas estudadas e a infecção pelos referidos agentes etiológicos.

Discussão

Os achados deste trabalho despertaram a preocupação para as infecções ocasionadas por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em mustelídeos nos recursos fluviais amazônicos, particularmente em ariranhas, onde a frequência destes patógenos estiveram superiores aos estudos realizados com lontra-europeia, *Lutra lutra*, na Espanha (Mendez-Hermida et al. 2007) e lontra-canadense, *Lontra canadensis*, nos Estados Unidos e Canadá (Gaydos et al. 2007).

Em estudos contemplando outras espécies de mamíferos aquáticos, foi constatada a prevalência de *Cryptosporidium* spp. em 5,1% em baleia-da-groenlândia, *Balaena mysticetus* e 24,5% em baleia-franca-do-Atlântico Norte, *Eubalaena glacialis* (Hughes-Hanks et al. 2005), 21,4% em golfinho-nariz-de-garrafa, *Tursiops truncatus* e 22,2% em golfinho-listrado, *Stenella coeruleoalba* (Reboredo-Fernández et al. 2015), 4,3% em peixes-bois amazônicos, *Trichechus inunguis* e 25% em peixes-bois marinhos, *Trichechus manatus* (Borges et al. 2011). Adicionalmente, nas pesquisas com *Giardia* sp. verificou-se a ocorrência deste protozoário em 64.5% em focas-aneladas, *Phoca hispida* (Hughes-Hanks et al. 2005), 50% em foca-da-groenlândia, *Phoca groenlandica* (Measures e Olson 1999) e 33.3% em baleia-da-groenlândia (Hughes-Hanks et al. 2005).

A co-infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. foi diagnosticada tanto em lontras neotropicais como em ariranhas. Este fato pode ser resultante, dentre outros fatores, da condição inerente aos animais acometidos, tendo em vista aspectos relacionados com a imunidade e idade (Xiao et al. 2002; Carey et al. 2004; Lasek-Nesselquist et al. 2008), como também a característica destes agentes, os quais apresentam alta resistência, rápida disseminação nos recursos hídricos (Lechevallier et al. 1991; Fayer et al. 2004) e alta morbidade (Cacciò et al. 2005). A ocorrência destes protozoários simultaneamente também foi constatada em lontra-europeia (Méndez-Hermida et al. 2007), baleia-minke e golfinho-listrado (Reboredo-Fernández et al. 2015), leões-marinhos-da-califórnia, *Zalophus californianus* (Deng et al. 2000), baleia-franca-do-Atlântico Norte, baleia-da-groenlândia e foca-anelada (Hughes-Hanks et al. 2005).

Apesar de não ter existido associação entre as áreas estudadas e a infecção pelos protozoários avaliados, as evidências inerentes à ocorrência de *Cryptosporidium* spp. nos recursos fluviais amazônicos, foi anteriormente evidenciada por meio deste coccídio acometendo os peixes-bois-amazônicos (Borges et al. 2007). Na ocasião, entre os prováveis fatores relacionados à disseminação destes agentes etiológicos foram destacadas as limitações sanitárias observadas em diversas comunidades ao longo dos rios e igarapés estudados na região, assim como os dejetos de origem animal provenientes das atividades pecuárias e aqueles liberados por embarcações (Borges et al. 2007). Evidências semelhantes foram observadas nas infecções ocasionadas por

Cryptosporidium spp. e *Giardia* sp. em lontra-canadense e em outras espécies de mamíferos aquáticos (Deng et al. 2000; Hughes-Hanks et al. 2005; Gaydos et al. 2007).

Ainda que grande parte das áreas avaliadas neste estudo encontravam-se em bom estado de conservação ambiental, em diversas localidades, além dos impactos antrópicos relatados, observou-se a presença de grandes extensões de desmatamento, o represamento de rios para a construção de hidrelétricas e a extração mineral. Estes fatores podem alterar o equilíbrio ecológico e, conseqüentemente, contribuir com a contaminação dos agentes patogênicos aos seus hospedeiros silvestres (Lallo et al. 2009; Patz et al. 2000; Palmeirim et al. 2014).

Como a frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. tanto em lontras neotropicais como em ariranhas, foi maior no período chuvoso do que no período seco, é importante destacar que ao longo dessas áreas estudadas na região Norte do Brasil, ocorre uma variação sazonal no nível dos rios e seus tributários, que influencia os diversos ecossistemas aquáticos associados (Junk et al. 1989). Este fenômeno é decorrente do degelo dos Andes associado às estações das chuvas, que em determinadas localidades pode ocasionar uma variação anual no nível médio de água em até 10 metros (Lima 2009).

Nestas ocasiões, as áreas ocupadas por ariranhas e lontras neotropicais permanecem vulneráveis aos períodos de inundação, o que influencia diretamente na utilização do recurso a ser explorado. Nos períodos de menor precipitação, estas espécies deixam as áreas alagadas durante a enchente e ocupam os corpos d'água principais, onde há maior disponibilidade de espaço, alimentos (Lima 2009) e ambientes propícios para se refugiarem (Duplaix 1980).

Em paralelo a isto, no período chuvoso, grande parte das pastagens utilizadas nas atividades pecuárias ficam alagadas e por vezes estes locais passam a ser utilizados pelas lontras neotropicais e ariranhas, tornando estas espécies ainda mais vulneráveis nesta estação climática, considerando o grande potencial para a contaminação ambiental apresentado pelos bovinos, onde um único bezerro infectado pode eliminar aproximadamente de um a 10 bilhões de oocistos nas fezes durante uma semana (Fayer et al. 2004).

A identificação de lontras neotropicais e ariranhas como hospedeiros de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp., aliado à capacidade dos oocistos e cistos respectivamente destes protozoários permanecerem infectantes em condições ambientais por um longo período de tempo (Lechevallier et al. 1991), amplia a possibilidade de transmissão destes agentes para outros organismos aquáticos, terrestres e populações humanas.

Neste sentido, as evidências deste trabalho despertam para a importância de ser realizada a caracterização genética dos protozoários estudados, como forma de elucidar as interferências das atividades humanas como potencial fonte de infecção destes coccídios às lontras e ariranhas. Os

achados deste trabalho constituem a primeira descrição da infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. acometendo *Lontra longicaudis* e *Pteronura brasiliensis*.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio de todos os funcionários da Fundação Mamíferos Aquáticos, Biolex Consultoria Ambiental, Sete Soluções e Tecnologia Ambiental e STCP Engenharia de Projetos Ltda. Os autores agradecem ainda a MRN pelo apoio ao desenvolvimento de estudos na FLONA de Saracá-Taquera, ao ICMBio-Trombetas e IBAMA pela emissão das licenças de pesquisa na Unidade. O resultado deste trabalho é parte dos esforços do Projeto Viva o Peixe-Boi Marinho. O João C. G. Borges agradece ainda a CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Referências

- Appelbee AJ, Thompson RCA, Measures LM, Olson ME (2010) *Giardia* and *Cryptosporidium* in harp and hooded seals from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Vet Parasitol* 173:19-23
- Ayres JM (1993) As matas de várzea de Mamirauá. Belém: Sociedade Civil Mamirauá
- Ayres JM, Fonseca GAB, Rylands AB, Queiroz HL, Pinto LP, Masterson D, Cavalcanti RB (2005) Os corredores ecológicos das florestas tropicais do Brasil. Belém: Sociedade Civil Mamirauá
- Bica VC, Dillenburg AF, Tasca T (2011) Diagnóstico laboratorial da giardiose humana: comparação entre as técnicas de sedimentação espontânea em água e de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco. *Rev. HCPA* 31:39-45
- Bonde R, Aguirre AA, Powell J (2004) Manatees as sentinels of marine ecosystem health: are they the 2000 pound canaries? *EcoHealth* 1:255-262
- Borges JCG, Alves LC, Faustino MAG, Marmontel M (2011) Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Antillean manatees (*Trichechus manatus*) and Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*) from Brazil. *J Zoo Wildl Med* 42:593-596
- Borges JCG, Alves LC, Lima DS, Luna FO, Aguilar CVC, Vergara-Parente, JE, Faustino, MAG, Lima AMA, Marmontel M (2007) Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em manatí Amazônico (*Trichechus inunguis*, NATTERER, 1883). *Biotemas* 20:63-66
- Brasil (1996) Ministério da Saúde. Infecções oportunistas por parasitas em AIDS: técnicas de diagnóstico. Brasília, DF
- Cacciò SM, Thopson RCA, Mclauchlin J, Smith HV (2005) Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* 21:426-431

- Carey CM, Lee H, Trevors JT (2004) Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res* 38:818-862
- Carter SK, Rosas FCW (1997) Biology and conservation of the giant otter *Pteronura brasiliensis*. *Mammal Rev* 27:1-26
- Coletti LD, Michel T, Sanfelice D, Jardim MMA (2013) Uso do espaço por *Lontra longicaudis* (Mustelidae, Carnivora) em ambiente alterado no rio Caí, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Sér Zool* 13:240-245
- Crawley MJ (2013) *The R Book*. 2 ed. Wiley, London
- Deng M, Peterson RP, Cliver DO (2000) First findings of *Cryptosporidium* and *Giardia* in California sea lions (*Zalophus californianus*). *J Parasitol* 86:490-494
- Duplax N (1980) Observations on the ecology and behaviour of the giant otter *Pteronura brasiliensis* in Suriname. *Rev Ecol* 34: 495-620
- Fayer R, Dubey JP, Lindsay DS (2004) Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol* 20:531-536
- Gaydos JK, Miller WA, Gilardi KVK, Melli A, Schwantje H, Fritz H, Conrad PA (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* in Marine-Foraging River Otters (*Lontra canadensis*) from the Puget Sound Georgia Basin Ecosystem. *J Parasitol* 93:198-202
- Hughes-Hanks JM, Rickard LG, Panuska C, Saucier JR, Dehn L, Rolland RM (2005) Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Five Marine Species. *J Parasitol* 91:1255-1228
- Junk WJ, Bayley PB, Sparks RE (1989) The flood pulse concept in river-floodplain systems. *Can J Fish Aquatic Sci* 106:110-127
- Junk WJ, Mello JASN (1990) Impactos ecológicos das represas hidrelétricas na bacia amazônica brasileira. *Estud Av* 4:126-143
- Lallo MA, Pereira A, Araújo R, Favorito SE, Bertolla P, Bondan EF (2009) Ocorrência de *Giardia*, *Cryptosporidium* e microsporídios em animais silvestres em áreas de desmatamento no Estado de São Paulo, Brasil. *Cienc Rural* 39:1465-1470
- Lasek-Nesselquist E, Bogomolni AL, Gast RJ, Welch DM, Ellis JC, Sogin ML, Moore MJ (2008) Molecular characterization of *Giardia intestinalis* haplotypes in marine mammals: variation and zoonotic potential. *Dis Aquat Organ* 81:39-51
- Lechevallier MW, Norton WD, Lee RG (1991) Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Surface Water Supplies. *Appl Environ Microb* 57:2610-2616
- Lima DS (2009) Ocorrência de ariranhas *Pteronura brasiliensis* (Carnivora: Mustelidae) e interferências antrópicas à espécie no lago Amanã, Reserva de Desenvolvimento Sustentável Amanã, Amazonas. Dissertação, Universidade Federal do Amapá

Lima DS, Marmontel M, Bernard E (2013) Reoccupation of historical areas by the endangered giant river otter *Pteronura brasiliensis* (Carnivora: Mustelidae) in Central Amazonia, Brazil. *Mammalia* 78:1-8

Méndez-Hermida F, Gómez-Couso H, Ares-Mazás E (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild otters (*Lutra lutra*). *Vet Parasitol* 144:153-156

Measures LN, Olson M (1999) Giardiasis in Pinnipeds from Eastern Canada. *J Wildlife Dis* 35:779-782

Monteiro MA (2005) Meio século de mineração industrial na Amazônia e suas implicações para o desenvolvimento regional. *Estud Avan* 19:187-207

Morgan UM, Xiao L, Hill BD, Lal A, Thompson RCA (2000) Detection of the *Cryptosporidium parvum* “Human” Genotype in a Dugong (*Dugong dugon*). *J Parasitol* 86:1352-1354

Palmeirim AF, Peres CA, Rosas FCW (2014) Giant otter population responses to habitat expansion and degradation induced by a mega hydroelectric dam. *Biol Conserv* 174:30-38

Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY (2000) Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol* 30:1394-1405

Quinn GP, Keogh MJ (2002) *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press, New York, EUA

R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. Accessed 10 November 2015

Reboredo-Fernández A, Ares-Mazás E, Martínez-Cedeira JA, Romero-Suances R, Cacciò SM, Gómez-Couso H (2015) *Giardia* and *Cryptosporidium* in cetaceans on the European Atlantic coast. *Parasitol Res* 114:693-698

Rengifo-Herrera C, Ortega-Mora LM, Gómes-Bautista M, García-Moreno FT, García-Párraga D, Castro-Urda J, Pedraza-Díaz S (2011) Detection and characterization of a *Cryptosporidium* isolate from a southern elephant seal (*Mirounga leonina*) from the Antarctic Peninsula. *Appl Environ Microb* 77:1524-1527

Ueno H, Gonçalves PC (1994) *Manual para Diagnóstico das Helmintoses de Ruminantes*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Wagnerová P, Sak B, Mcevoy J, Rost M, Kvac M (2015) Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in the Czech Republic and Poland. *Parasitol Res*. Doi:10.1007/s00436-015-4353-y

Xiao L, Sulaiman IM, Ryan UM, Zhou L, Atwill ER, Tischler ML, Zhang X, Fayer R, Lal AS (2002) Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Int J Parasitol* 32:1773-1785

7. CAPÍTULO IV

Infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em mamíferos aquáticos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil

Capítulo estruturado em formato de artigo e será submetido para o periódico *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*.

7. Infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em mamíferos aquáticos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil

Resumo

Os mamíferos aquáticos com ocorrência em águas fluviais e marinhas do Brasil encontram-se susceptíveis a diversos agentes parasitários. Mediante a importância crescente das enfermidades desencadeadas por protozoários, este trabalho teve como objetivo avaliar a frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em mamíferos aquáticos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Para isto foram coletadas 553 amostras fecais provenientes de 15 espécies de mamíferos aquáticos, mantidos em cativeiro e de vida livre, nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Todas as amostras obtidas foram submetidas à técnica de Kinyoun, para a identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. A pesquisa de cistos de *Giardia* sp., foi realizada por meio da técnica de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco. Posteriormente, todas as amostras foram submetidas ao teste de imunofluorescência direta. A frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. foi de 15% (86/553) e 9,04% (50/553) para *Giardia* sp. A presença de *Cryptosporidium* spp. foi constatada em cinco espécies, sendo estas, a *Lontra longicaudis* (15,28%), *Pteronura brasiliensis* (41,66%), *Sotalia guianensis* (9,67%), *Trichechus inunguis* (16,03%) e *Trichechus manatus* (13,79%). No que concerne à ocorrência de *Giardia* sp., este coccídio foi diagnosticado em *L. longicaudis* (9,23%), *P. brasiliensis* (29,16%), *Kogia breviceps* (100%), *Kogia sima* (25%), *S. guianensis* (9,67%), *T. inunguis* (3,81%) e *T. manatus* (10,34%). A realização deste estudo possibilitou avaliar aspectos da sanidade de diferentes espécies de mustelídeos, cetáceos e sirênios, incluindo algumas ameaçadas. Neste estudo, de forma inédita, a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. foi relatada em *L. longicaudis*, *P. brasiliensis* e *S. guianensis*, enquanto que a infecção por *Giardia* sp., além das duas primeiras espécies de mamíferos aquáticos mencionadas, foi também diagnosticada em *T. manatus* e *T. inunguis*, ampliando assim, o número de hospedeiros susceptíveis a estes agentes parasitários.

Palavras-Chave: Protozoários; doenças parasitárias; zoonoses; mamíferos marinhos; conservação.

Abstract

Aquatic mammals with occurrence in land and marine waters in Brazil are susceptible to different parasitic agents. Given the growing importance of diseases that are triggered by protozoa, the aim of the present study was to assess the frequency of infections by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* sp. among aquatic mammals in the North and Northeast of Brazil. In total 553 fecal samples were

collected from 15 species of aquatic mammals (in the wild and in captivity) in these two regions. All of the samples obtained were submitted to the Kinyoun technique to identify the oocysts of *Cryptosporidium* spp. Cysts of *Giardia* sp. were identified by centrifugal flotation in zinc sulphate solution. Subsequently, all of the samples were submitted to the direct immunofluorescence test. The frequency rates for infections by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* sp. were 15% (86/553) and 9.04% (50/553), respectively. The presence of *Cryptosporidium* spp. was confirmed in five species: *Lontra longicaudis* (15.28%); *Pteronura brasiliensis* (41.66%); *Sotalia guianensis* (9.67%); *Trichechus inunguis* (16.03%) and *Trichechus manatus* (13.79%). *Giardia* sp. was diagnosed in the following species: *L. longicaudis* (9.23%); *P. brasiliensis* (29.16%); *Kogia breviceps* (100%); *Kogia sima* (25%); *S. guianensis* (9.67%); *T. inunguis* (3.81%) and *T. manatus* (10.34%). This research enabled an assessment of health-related aspects of different species of mustelidae, cetaceans and sirenia, including a number of threatened species. For the first time, the present study confirmed the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in *L. longicaudis*, *P. brasiliensis* and *S. guianensis*. The infection caused by *Giardia* sp., as well as the abovementioned species of mammals, was also diagnosed in *T. manatus* and *T. inunguis*, thereby increasing the number of hosts that are susceptible to these parasitic agents.

Keywords: Protozoa; parasitic diseases; zoonoses; marine mammals; conservation.

Introdução

Nos limites territoriais do Brasil é constatada uma rica diversidade de mamíferos aquáticos, constituída por 59 espécies desta mastofauna, presentes em ambientes oceânicos, marinhos, costeiros, estuarinos e de águas interiores, distribuídos de forma contínua ou sazonal (Rocha-Campos *et al.*, 2010; Icmbio, 2011).

Em muitas ocasiões, estas espécies vivem em interfaces de ambientes em que ocorre uma interação significativa com as populações humanas, tornando-as vulneráveis às transformações e às perturbações de origem antrópica (Rocha-Campos *et al.*, 2010), tais como as capturas incidentais ou intencionais (Ott *et al.*, 2002; Luna *et al.*, 2008; Pontalti & Danielski, 2011), utilização desordenada de embarcações motorizadas (Borges *et al.*, 2007a), contaminação física, química e orgânica (Yogui *et al.*, 2003), a intensa degradação dos habitats (Amaral & Jablonski, 2005), além da ocorrência de patógenos de origem viral (Sierra *et al.*, 2015), bacteriana (Vergara-Parente *et al.*, 2003; Delport *et al.*, 2015) e parasitária (Barbosa *et al.*, 2015).

Inerente às enfermidades parasitárias, as infecções ocasionadas por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. (Deng *et al.*, 2000; Appelbee *et al.*, 2010), considerados agentes zoonóticos oportunistas (Xiao *et al.*, 1998; Fayer *et al.*, 2004), têm sido relatadas em diversas espécies de

cetáceos (Altieri *et al.*, 2007; Reboredo-Fernández *et al.*, 2015), sirênios (Hill *et al.*, 1997; Borges *et al.*, 2011) e pinípedes (Deng *et al.*, 2000).

A transmissão destes patógenos pode ocorrer facilmente pela ingestão de água e alimentos contaminados (Fayer *et al.*, 2004), representando um risco para a infecção dos mamíferos aquáticos, que podem apresentar manifestações clínicas ou subclínicas (Deng *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2004; Santín *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2011).

A possibilidade de ocorrência destes coccídios sem manifestações clínicas evidentes reforça a necessidade de monitorar a sanidade das populações de mamíferos aquáticos de vida livre, contribuindo ainda, com as estratégias de reabilitação e manutenção dos espécimes cativos (Kimber & Kollias, 2000) e evitando a disseminação destes patógenos ao ambiente, através dos animais destinados aos programas de reintrodução (Kimber & Kollias, 2000).

Mediante a importância crescente dos referidos protozoários, este trabalho teve como objetivo avaliar a frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em mamíferos aquáticos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.

Material e Métodos

Áreas de Estudo

As atividades ocorreram em quatro estados da região Norte, contemplando o Amapá (rio Jari), Amazonas (lago Amanã e lago Tefé), Pará (Igarapés Araticum e Saracá, lago Sapucaá e rio Tapajós) e Rondônia (rio Madeira), assim como seis estados da região Nordeste, considerando o litoral dos estados de Alagoas (Pontal do Peba), Bahia (Sitio do Conde e Mangue Seco), Ceará, Maranhão (Turiaçu), Paraíba e Sergipe.

A região Norte encontra-se inserida no bioma amazônico, composto por grandes extensões de floresta tropical, com áreas inundáveis de várzea, igapó e florestas de terra firme (Ayres *et al.*, 2005). Estes ambientes constantemente sofrem alterações em decorrência aos índices pluviométricos, de tal forma que, o período da enchente e cheia dos rios acontece, geralmente, entre novembro e junho, enquanto a vazante e seca, ocorrem entre o final de junho e início de novembro (Ayres, 1993; Lima, 2009).

Por outro lado, a região litorânea do Nordeste, apresenta o clima tropical quente e úmido, caracterizado pela ausência de chuvas de verão e sua ocorrência no inverno, que corresponde a estação chuvosa (Golfari *et al.*, 1978). Constata-se ao longo destas áreas, a presença de uma grande diversidade de ecossistemas, contemplando praias, dunas, falésias, recifes de corais, estuários, manguezais, assim como a presença de ambientes marinhos (Cunha, 2005; Muehe & Garcez, 2005).

Coleta de Amostras Biológicas

A coleta do material biológico ocorreu durante o período de 2011 até 2015, tanto no período chuvoso como na estação seca, totalizando 553 amostras fecais, sendo estas provenientes de mustelídeos, cetáceos e sirênios, contemplando a avaliação coproparasitológica de 15 espécies de mamíferos aquáticos (Tabela 1). As amostras fecais obtidas foram provenientes tanto de espécies marinhas como fluviais, assim como de animais de vida livre e mantidos em cativeiro.

Após a coleta, o material foi acondicionado em frascos contendo solução constituída de álcool, formol, ácido acético glacial e água destilada (AFA), em proporções sugeridas por Ueno e Gonçalves (1994), sendo estas devidamente identificadas e encaminhadas para o processamento laboratorial.

Todos os procedimentos foram submetidos para a avaliação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sendo concedido a licença de Número 33.819-1. Além disto, esta pesquisa foi avaliada e autorizada pela Comissão de Ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco (010/2014).

Tabela 1: Procedência das amostras fecais provenientes das 15 espécies de mamíferos aquáticos.

Ordem	Espécie	Habitat	Região/Estado/Número de Amostras										Origem da Amostra	Total de Amostras
			Norte					Nordeste						
			PA	AP	RO	AM	BA	SE	AL	PB	CE	MA		
Carnívora - Família Mustelidae	<i>Lontra longicaudis</i>	Fluvial	33	230	38	12	-	1	-	-	-	-	Locais de descanso, saídas de locas, sítios de defecação, reabilitação	314
	<i>Pteronura brasiliensis</i>	Fluvial	6	8	9	1	-	-	-	-	-	-	Locais de descanso, saídas de locas, sítios de defecação	24
Cetartiodactyla	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Marinho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	Necropsia	2
	<i>Grampus griseus</i>	Marinho	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	Necropsia	1
	<i>Inia geoffrensis</i>	Fluvial	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	Coleta de amostra durante o manejo de espécimes de vida livre	2
	<i>Kogia breviceps</i>	Marinho	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	Necropsia	1
	<i>Kogia sima</i>	Marinho	-	-	-	-	-	2	-	-	2	-	Necropsia	4
	<i>Peponocephala electra</i>	Marinho	-	-	-	-	-	3	2	-	3	-	Necropsia	8
	<i>Physeter macrocephalus</i>	Marinho	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	Necropsia	2
	<i>Sotalia guianensis</i>	Marinho	-	-	-	-	5	21	4	1	-	-	Necropsia	31
	<i>Stenella attenuata</i>	Marinho	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	Necropsia	1
	<i>Stenella clymene</i>	Marinho	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	Necropsia	2
<i>Ziphius cavirostris</i>	Marinho	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	Necropsia	1	
Sirenia	<i>Trichechus inunguis</i>	Fluvial	88	-	-	43	-	-	-	-	-	-	Amostras sobrenadante coletadas em áreas de alimentação; animais de cativeiro	131
	<i>Trichechus manatus</i>	Marinho	-	8	-	-	-	2	-	18	1	-	Animais de cativeiro; animais reintroduzidos; necropsia	29

PA (Pará), AP (Amapá), RO (Rondônia), AM (Amazonas), BA (Bahia), SE (Sergipe), AL (Alagoas), PB (Paraíba), CE (Ceará), MA (Maranhão).

Processamento Laboratorial

Todas as amostras obtidas foram submetidas à sedimentação pelo formol-éter com posterior confecção dos esfregaços e coloração através da técnica de Kinyoun (Brasil, 1996), para a identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. A pesquisa de cistos de *Giardia* sp. foi realizada por meio da técnica de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (Appelbee *et al.*, 2010; Bica *et al.*, 2011).

Posteriormente, todas as amostras foram submetidas ao teste de imunofluorescência direta, conforme as recomendações do Kit Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*, sendo os oocistos e cistos identificados com base na sua forma, tamanho e o padrão da intensidade da imunofluorescência (Reboredo-Fernández *et al.*, 2015).

As amostras foram consideradas positivas, quando um dos testes utilizados, permitiu a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* sp. (Borges *et al.*, 2011).

Análise dos dados

Para investigar a associação dos protozoários, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp., com outros fatores, tais como o período climático (seco ou chuvoso), o ambiente (fluvial ou marinho), a condição de manutenção dos animais (cativeiro ou vida livre) e os locais de coleta foram executados o teste de qui-quadrado de Pearson para cada par de variável. Nos casos em que os valores esperados do qui-quadrado foram menores que cinco em mais de 20% das frequências, foi executado o Teste Exato de Fisher (Quinn & Keough, 2002). Todas as análises foram executadas no programa R (R Core Team, 2015).

Resultados

Ao ser avaliada a ocorrência dos protozoários estudados, considerando as espécies de mamíferos aquáticos aqui estudadas, a frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. foi de 15% (86/553) e 9,04% (50/553) para *Giardia* sp.

A presença de *Cryptosporidium* spp. foi constatada em cinco espécies, sendo estas, a *Lontra longicaudis* (15,28%), *Pteronura brasiliensis* (41,66%), *Sotalia guianensis* (9,67%), *Trichechus inunguis* (16,03%) e *Trichechus manatus* (13,79%). No que concerne à ocorrência de *Giardia* sp., este agente foi diagnosticado em um maior número de espécies, conforme constatado em *L. longicaudis* (9,23%), *P. brasiliensis* (29,16%), *Kogia breviceps* (100%), *Kogia sima* (25%), *S. guianensis* (9,67%), *T. inunguis* (3,81%) e *T. manatus* (10,34%). A infecção concomitante destes dois agentes etiológicos foi constatada em *L. longicaudis* (4,45%), *P. brasiliensis* (20,83%), *S. guianensis* (3,22%) e *T. inunguis* (0,76%).

Na avaliação realizada quanto aos habitats utilizados, a porcentagem de infecção por *Cryptosporidium* spp. foi maior em espécies que utilizam os recursos fluviais (17,40%), do que aquelas encontradas nos ambientes marinhos, tanto costeiros como oceânicos (8,53%). Apesar desta diferença, a associação deste agente etiológico e o habitat utilizado foi marginalmente significativo (χ^2 3,7603, gl = 1, p = 0,05248).

De maneira contrária, a presença de *Giardia* sp. foi diagnosticada com valores aproximados, sendo ligeiramente superior nos recursos marinhos (09,75%), do que nos fluviais (08,91%), porém sem haver diferença significativa (χ^2 0,3535, gl = 1, p = 0,5522).

Entre os mamíferos marinhos, a infecção por *Cryptosporidium* spp. foi maior em espécies costeiras (11,66%) do que naquelas que utilizam os ambientes oceânicos (0%). Por outro lado, a presença de *Giardia* sp. foi encontrada com maior frequência em espécies oceânicas (40%), do que costeiras (10%).

As infecções ocasionadas por *Cryptosporidium* spp. (χ^2 = 0,0138, gl = 1, p = 0,9066) e *Giardia* sp. (χ^2 = 0,4217, gl = 1, p = 0,5161) ocorreram de forma independente à estação climática. De forma semelhante, não houve relação entre a presença de *Cryptosporidium* spp. (p = 0,3831) e *Giardia* sp. (p = 0,4783) com os locais de coleta das amostras nos diferentes estados.

A infecção dos referidos protozoários foi maior em animais de vida livre (*Cryptosporidium* spp. = 16,2%; *Giardia* sp. = 9,6%), do que nos animais mantidos em cativeiro (*Cryptosporidium* spp. = 9,43%; *Giardia* sp. = 3,77%). Entretanto, apesar desta diferença, a associação tanto de *Cryptosporidium* spp. (χ^2 = 1,754, gl = 1, p = 0,1854), quanto *Giardia* sp. (χ^2 = 1,978, gl = 1, p = 0,1596) e a condição em que os animais encontravam-se mantidos foram independentes.

Discussão

A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em *P. brasiliensis* e *L. longicaudis* apresentaram a frequência de infecção superior aquelas observadas em outros mustelídeos relatados na literatura, conforme reportado em *Lutra lutra* (Méndez-Hermida *et al.*, 2007) e *Lontra canadensis* (Gaydos *et al.*, 2007). No que concerne à presença de *Giardia* sp., os resultados aqui encontrados foram superiores ao constatado em *L. lutra* (Méndez-Hermida *et al.*, 2007) e abaixo ao que foi diagnóstico em *L. canadensis* (Gaydos *et al.*, 2007).

Na ordem Cetartiodactyla, a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. aqui reportadas foram semelhantes às frequências observadas na Europa (Reboredo-Fernández *et al.*, 2015) e América do Norte (Hughes-Hanks *et al.*, 2005).

Adicionalmente, a infecção ocasionada por *Cryptosporidium* spp. entre os sirênios avaliados foi superior ao observado por Borges *et al.* (2011) em *T. inunguis* e inferior nos *T.*

manatus. Vale salientar que a ocorrência de *Giardia* sp. nesta ordem de mamíferos aquáticos ainda não tinha sido diagnosticada.

De acordo com Borges *et al.* (2011), a alta frequência da infecção em sirênios esteve associada aos animais mantidos em cativeiro, sendo sugerido a transmissão hídrica dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., ou ainda, fatores relacionados ao manejo, tais como a oferta de alimentos e o contato com tratadores. Ainda neste estudo, os autores mencionaram que a qualidade ambiental dos recursos hídricos da Amazônia, poderia ter contribuído para uma menor taxa de animais diagnosticados com o referido protozoário.

Entretanto, no estudo aqui reportado, considerando a origem das amostras obtidas, ainda que a diferença não tenha sido estatisticamente significativa, a frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. foi maior nos animais de vida livre do que naqueles mantidos em cativeiro. Estes resultados são discordantes aqueles observados em outros estudos com peixes-bois marinhos (Borges *et al.*, 2011) e leão-marinho-australiano, *Neophoca cinerea* (Delpont *et al.*, 2014), onde os animais cativos foram mais acometidos.

Com esta abordagem, os dados obtidos permitiram verificar que a infecção por *Cryptosporidium* spp. foi maior nas espécies que utilizavam os recursos fluviais, enquanto que a ocorrência de *Giardia* sp. foi relativamente semelhante entre os mamíferos marinhos e os fluviais. O comprometimento dos recursos fluviais amazônicos por estes protozoários foi anteriormente reportado por Borges *et al.* (2007b), em estudos realizados com *T. inunguis*.

Estes antecedentes atribuíram a vinculação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. aos recursos hídricos, em virtude da ausência de sistemas de tratamento dos efluentes domésticos, a liberação dos resíduos fecais humanos pelas embarcações regionais, bem como os dejetos de origem agropecuária que são carregados para os rios e igarapés da região (Borges *et al.*, 2007b). Adicionalmente, a disseminação destes coccídios pode ocorrer através das fezes de animais domésticos e silvestres (Dixon *et al.*, 2008), assim como em cativeiro, a transmissão pode ocorrer de forma indireta, por meio da água ou alimentos contaminados (Kimber & Kollias, 2000; Borges *et al.*, 2007c; Delpont *et al.*, 2014).

Embora neste estudo as estações climáticas não tenham apresentado uma relação significativa na ocorrência dos protozoários estudados, a grande variação na amplitude dos recursos fluviais amazônicos em decorrência das chuvas, influencia diretamente os ecossistemas aquáticos associados (Junk *et al.*, 1989), transformando áreas de pastagens utilizadas por bovinos e equinos durante o período da seca, em áreas alagadas e utilizadas pelos mamíferos aquáticos durante o período da cheia.

A grande probabilidade de disseminação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* sp. por meio das espécies domésticas, assim como a capacidade destes protozoários permanecerem infectantes em condições ambientais por um longo período de tempo (Fayer *et al.*, 2004) ampliam as possibilidades de infecção pelos mamíferos aquáticos. Em paralelo, na região Nordeste, durante o período chuvoso verifica-se um maior aporte de resíduos, incluindo os de origem fecal, por meio dos recursos fluviais da região, sendo estes desembocados nos ambientes costeiros e marinhos (Silva-Cavalcanti *et al.*, 2013).

Preocupações neste sentido foram descritas em estudos realizados com pinípedes, onde a alta prevalência de *Cryptosporidium* e *Giardia* esteve associado às condições dos habitats, de tal modo que, durante os meses de verão, os ambientes costeiros permaneciam mais contaminados com oocistos e cistos provenientes de dejetos humanos e animais terrestres do que as áreas marinhas utilizadas pelas populações de foca-anelada, *Phoca hispida* e foca-barbuda, *Erignatus barbatus* (Dixon *et al.*, 2008).

A realização deste estudo possibilitou avaliar aspectos da sanidade de diferentes espécies de mustelídeos, cetáceos e sirênios, incluindo algumas ameaçadas. Esta abordagem metodológica apresentou-se como um importante caminho para identificar a veiculação de patógenos aos mamíferos aquáticos, sendo possível ainda, evidenciar por meio destes animais, um indicativo prévio da qualidade dos habitats utilizados por estes (Bonde *et al.*, 2004; Bossart, 2011).

Estas evidências acerca do comprometimento destes habitats utilizados, reforçam a necessidade de estudos adicionais que possam por meio de técnicas moleculares, realizar a genotipagem destes protozoários, sendo isto vital para entender o potencial zoonótico das formas isoladas e identificar os reservatórios para a infecção humana (Appelbee *et al.*, 2010).

Por meio deste estudo, de forma inédita, a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. foi relatada em *L. longicaudis*, *P. brasiliensis* e *S. guianensis*, enquanto que a infecção por *Giardia* sp., além das duas primeiras espécies de mamíferos aquáticos mencionadas, foi também diagnosticada em *T. manatus* e *T. inunguis*, ampliando assim, o número de hospedeiros susceptíveis a estes agentes parasitários.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio de todos os funcionários da Fundação Mamíferos Aquáticos, Biolex Consultoria Ambiental, Sete Soluções e Tecnologia Ambiental e STCP Engenharia de Projetos Ltda. O resultado deste trabalho é parte dos esforços do Projeto Viva o Peixe-Boi Marinho. O João C. G. Borges agradece ainda a CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Referências

- Altieri B.L., Vianna D.A. and Meirelles A.C.O.** (2007) Isolation of *Giardia* sp. from an estuarine dolphin (*Sotalia guianensis*) in Ceará state, Northeastern Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Mammals* 6, 113-116.
- Amaral A.C.Z., Jablonski S.** (2005) Conservação da biodiversidade marinha e costeira no Brasil. *Megadiversidade* 1, 43-51.
- Appelbee A.J., Thompson R.C.A., Measures L.M. and Olson M.E.** (2010) *Giardia* and *Cryptosporidium* in harp and hooded seals from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Veterinary Parasitology* 173, 19-23.
- Ayres J.M.** (1993) *As matas de várzea de Mamirauá*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá.
- Ayres J.M., Fonseca G.A.B., Rylands A.B., Queiroz H.L., Pinto L.P., Masterson D. and Cavalcanti R.B.** (2005) *Os corredores ecológicos das florestas tropicais do Brasil*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. 2005.
- Barbosa L., Johnson C.K., Lambourn D.M., Gibson A.K., Haman K.H., Huggins J.L., Sweeny A.R., Sundar N., Raverty S. and Grigg M.E.** (2015) A novel *Sarcocystis neuron* genotype XIII is associated with severe encephalitis in an unexpectedly broad range of marine mammals from the northeastern Pacific Ocean. *International Journal for Parasitology* 45, 595-603.
- Bica V.C., Dillenburg A.F. and Tasca T.** (2011) Diagnóstico laboratorial da giardiose humana: comparação entre as técnicas de sedimentação espontânea em água e de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco. *Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre* 31, 39-45.
- Bonde R.K., Aguirre A. and Powell J.** (2004) Manatees as sentinels of marine ecosystem health: are they the 2000-pound canaries? *EcoHealth* 1, 255-262.
- Borges J.C.G., Alves L.C., Lima D.S., Luna F.O., Aguilar C.V.C., Vergara-Parente J.E., Faustino M.A.G., Lima A.M.A. and Marmontel M.** (2007b) Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em manatí amazônico (*Trichechus inunguis*, Natterer, 1883). *Biotemas* 20, 63-66.

- Borges J.C.G., Alves L.C., Faustino M.A.G. and Marmontel M.** (2011) Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Antillean manatees (*Trichechus manatus*) and Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*) from Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 42, 593-596.
- Borges J.C.G., Alves L.C., Faustino M.A.G. and Lima A.M.A.** (2007c) Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) e funcionários envolvidos no manejo da espécie. *Estudos de Biologia* 29, 33-41.
- Borges J.C.G., Vergara-Parente J.E., Alvite C.M.C., Marcondes M.C.C. and Lima R.P.** (2007a) Embarcações motorizadas: uma ameaça aos peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) no Brasil. *Biota Neotropica* 7, 199-204.
- Bossart G.D.** (2011) Marine mammals as sentinel species for ocean and human health. *Veterinary Pathology* 48, 676-690.
- Brasil.** (1996) *Infecções oportunistas por parasitas em AIDS: técnicas de diagnóstico*. Brasília, DF.
- Cunha I.** (2005) Desenvolvimento Sustentável na Costa Brasileira. *Revista Galega de Economía* 14, 1-14.
- Delpont T.C., Asher A.J., Beaumont L.J., Webster K.N., Harcourt R.G. and Power M.L.** (2014) *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* occurrence in Australian sea lions (*Neophoca cinerea*) exposed to varied levels of human interaction. *International Journal for Parasitology* 3, 269-275.
- Delpont T.C., Harcourt R.G., Beaumont L.J., Webster K.N. and Power M.L.** (2015) Molecular detection of antibiotic-resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from the endangered Australian sea lion (*Neophoca cinerea*). *The Journal Wildlife Diseases* 51, 555-563.
- Deng M., Peterson R.P. and Cliver D.O.** (2000) First findings of *Cryptosporidium* and *Giardia* in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Journal of Parasitology* 86, 490-494.
- Dixon BR, Parrington LJ, Parenteau M, Leclair D, Santín M, Fayer R.** (2008) *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* 94, 1161-11163.
- Fayer R., Dubey J.P., Lindsay D.S.** (2004) Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends in Parasitology* 20, 531-536.
- Gaydos J.K., Miller W.A., Gilardi K.V.K., Melli A., Schwantje H., Fritz H. and Conrad P.A.** (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* in Marine-Foraging River Otters (*Lontra canadensis*) from the Puget Sound Georgia Basin Ecosystem. *Journal of Parasitology* 93, 198-202.
- Golfari L., Caser R.L., Moura V.P.G.** (1978) *Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil*. Belo Horizonte. Centro de Pesquisa Florestal da Região do Cerrado, 66 p.
- Hill B.D., Fraser I.R. and Prior H.C.** (1997) *Cryptosporidium* infection in a dugong (*Dugong dugon*). *Australian Veterinary Journal* 75, 670-671.
- Hughes-Hanks J.M., Rickard L.G., Panuska C., Saucier J.R., O'Hara T.M., Dehn L. and Rolland R.M.** (2005) Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in five marine species. *Journal of Parasitology* 91, 1255-1228.
- Icmbio.** (2011) *Plano de Ação Nacional para Conservação dos Mamíferos Aquáticos: grandes cetáceos e pinípedes*. III versão. 156 p.
- Junk W.J., Bayley P.B. and Sparks R.E.** (1989) The flood pulse concept in river-floodplain systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 106, 110-127.
- Kimber K.R. and Kollias G.V.** (2000) Infectious and parasitic diseases and contaminant-related problems of North American river otters (*Lontra canadenses*): a review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 31, 452-472.
- Lima D.S.** (2009) *Ocorrência de ariranhas Pteronura brasiliensis (Carnivora: Mustelidae) e interferências antrópicas à espécie no lago Amanã, Reserva de Desenvolvimento Sustentável Amanã, Amazonas*. Dissertação, Universidade Federal do Amapá, Amapá, Brasil.

- Luna F.O., Araújo J.P., Lima R.P., Pessanha M.M., Soavinski R.J. and Passavante J.Z.O.** (2008) Captura e utilização do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) no litoral Norte do Brasil. *Biotemas* 21, 115-123.
- Méndez-Hermida F., Gómez-Couso H., Romero-Suances R. and Ares-Mazás E.** (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild otters (*Lutra lutra*). *Veterinary Parasitology* 144, 153-156.
- Muehe D. and Garcez D.S.** (2005) A plataforma continental brasileira e sua relação com a zona costeira e a pesca. *Mercator* 4, 69-88.
- Olson M.E., Appelbee A. and Measures L.** (2004) *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in pinípedes. Zoonotic protozoa in the marine environment: a threat to aquatic mammals and public health. *Veterinary Parasitology* 125, 131-135.
- Ott PH, Secchi ER, Moreno IB, Danilewicz D, Crespo EA, Bordino P, Ramos R, Beneditto AP, Bertozzi C, Bastida R, Zanelatto R, Perez J, Kinas PG.** Report of the working group on fishery interactions. *LAJAM*. 2002; 1(1):55-64.
- Pontalti M. and Danielski M.** (2011) Registros de enredamentos de baleias-franca, *Eubalaena australis* (Cetacea, Mysticeti), na temporada reprodutiva de 2010, em Santa Catarina, Brasil. *Biotemas* 24, 109-112.
- Quinn G.P. and Keough M.J.** (2002) *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. New York: Cambridge University Press, 557 p.
- R Core Team.** *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reboredo-Fernández A., Ares-Mazás E., Martínez-Cedeira J.Á., Romero-Suances R., Caccio S.M. and Gómez-Couso H.** (2015) *Giardia* and *Cryptosporidium* in cetaceans on the European Atlantic coast. *Parasitology Research* 114, 693-698.
- Rocha-Campos C.C., Gusmão-Câmara I. and Pretto D.J.** (2010) *Plano de ação nacional para a conservação dos mamíferos aquáticos: pequenos cetáceos*. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, 132 p.

- Santín M., Dixon B.R. and Fayer R.** (2005) Genetic Characterization of *Cryptosporidium* Isolates From Ringed Seals (*Phoca hispida*) in Northern Québec, Canada. *Journal of Parasitology* 91, 712-716.
- Sierra E., Díaz-Delgado J., Arbelo M., Andrade M., Sacchini S., Fernández A.** (2015) Herpesvirus associated genital lesions in a stranded striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in the Canary Island, Spain. *The Journal Wildlife Diseases* 51, 696-702.
- Silva-Cavalcanti J.S., Araujo M.C.B. and Costa M.F.** (2013) Padrões e tendências a médio prazo da contaminação por resíduos sólidos na praia de Boa Viagem, Nordeste do Brasil. *Quaternary and Environmental* 04, 17-24.
- Ueno H. and Gonçalves P.C.** (1994) *Manual para Diagnóstico das Helminthoses de Ruminantes*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Vergara-Parente J.E., Sidrim J.J.C., Teixeira M.F.S., Marcondes M.C.C. and Rocha F.G.** (2003) Salmonellosis in an Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) calf: a fatal case. *Aquatic Mammals* 29, 131-136.
- Yogui G.T., Santos M.C.O. and Montone R.C.** (2003) Chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) from the Cananéia estuary, southeastern Brazil. *Science of the Total Environment* 312, 67-78.
- Xiao L., Sulaiman I., Fayer R. and Lal A.A.** (1998) Species and Strain-specific Typing of *Cryptosporidium* Parasites in Clinical and Environmental Samples. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93, 687-692.

8. CAPÍTULO V

Avaliação das técnicas parasitológicas e imunológicas no diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em mamíferos aquáticos

Capítulo estruturado em formato de artigo e será submetido para o periódico *Veterinary Parasitology*.

8. Avaliação das técnicas parasitológicas e imunológicas no diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em mamíferos aquáticos

Resumo

As infecções ocasionadas por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. estão entre as principais enfermidades gastroentéricas e acometem um grande número de animais e o homem. Em muitas situações, o curso da doença é assintomático podendo representar dificuldades para o diagnóstico envolvendo os mamíferos aquáticos. Assim torna-se de grande relevância a identificação de métodos laboratoriais apropriados e que possibilitem a identificação destes agentes parasitários. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a utilização de uma técnica imunológica com métodos parasitológicos no diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em mamíferos aquáticos. Foram coletadas 553 amostras fecais e conteúdo intestinal de 15 espécies, contemplando os mustelídeos, cetáceos e sirênios, sendo as amostras biológicas submetidas ao processamento laboratorial utilizando a técnica de Kinyoun para a identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., enquanto que a pesquisa de cistos de *Giardia* sp., empregou-se o método de centrifugo-flutuação em solução de sulfato de zinco. Posteriormente, todas as amostras foram submetidas a testes imunológicos, através da imunofluorescência direta. Para mensurar a concordância entre as técnicas utilizadas para detecção de cada parasito abordado neste estudo foi utilizado o Índice de Kappa. Adicionalmente, foi avaliada a sensibilidade, especificidade, prevalência real, prevalência estimada, valor preditivo, positivo, valor preditivo negativo, classificação correta (acurácia) e classificação incorreta. A presença de *Cryptosporidium* spp. foi constatada em *Lontra longicaudis* (15,28%), *Pteronura brasiliensis* (41,66%), *Sotalia guianensis* (9,67%), *Trichechus inunguis* (16,03%) e *Trichechus manatus* (13,79%). Ao que diz respeito à ocorrência de *Giardia* sp., este agente foi identificado em *L. longicaudis* (9,23%), *P. brasiliensis* (29,16%), *Kogia breviceps* (100%), *Kogia sima* (25%), *S. guianensis* (9,67%), *T. inunguis* (3,81%) e *T. manatus* (10,34%). Na avaliação do Índice de Kappa, ao que concerne ao diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. por meio do teste de imunofluorescência direta e a técnica de Kinyoun, foi encontrado o valor de $k = 0,86$. Com relação a identificação dos cistos de *Giardia* sp. através da técnica de centrifugo-flutuação e imunofluorescência direta, o valor de k foi de 0,27. Neste sentido, a técnica de imunofluorescência direta demonstrou maior sensibilidade tanto no diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. como de *Giardia* sp., sendo relevante a combinação de mais de uma técnica laboratorial empregada, buscando ser mais assertivo na detecção destes parasitos em mamíferos aquáticos.

Palavras-Chave: Protozoários, diagnóstico, doenças parasitárias, mustelídeos, cetáceos, sirênios.

Abstract

Infections caused by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* sp. are among the most common gastroenteric diseases, affecting large numbers of animals and humans. In many cases, the course of the disease is asymptomatic, which can hinder a diagnosis in aquatic mammals. So it is very important to identify appropriate laboratory methods and enable the identification of these parasitic agents. The aim of the present study was to assess the use of an immunological technique with parasitological methods to diagnose *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* sp. in aquatic mammals. In total, 553 fecal samples and intestinal content were collected, from 15 species (mustelidae, cetaceans and sirenia). The biological samples were processed by Kinyoun technique to identify the oocysts of *Cryptosporidium* spp. Centrifugal flotation in zinc sulphate solution was used to identify cysts of *Giardia* sp. Subsequently, all of the samples were submitted to immunological tests through direct immunofluorescence. The Kappa Index was used to measure the agreement between the different techniques used to detect each parasite addressed in the present study. The sensitivity, specificity, real prevalence, estimated prevalence, positive predictive value, negative predictive value, correct classification (accuracy) and incorrect classification were also assessed. The presence of *Cryptosporidium* spp. was confirmed in *Lontra longicaudis* (15.28%), *Pteronura brasiliensis* (41.66%), *Sotalia guianensis* (9.67%), *Trichechus inunguis* (16.03%) and *Trichechus manatus* (13.79%). *Giardia* sp. was identified in *L. longicaudis* (9.23%), *P. brasiliensis* (29.16%), *Kogia breviceps* (100%), *Kogia sima* (25%), *S. guianensis* (9.67%), *T. inunguis* (3.81%) and *T. manatus* (10.34%). In the Kappa Index assessment for the diagnosis of *Cryptosporidium* spp. using direct immunofluorescence and the Kinyoun technique, a value of $k = 0.86$ was confirmed. Concerning the identification of cysts of *Giardia* spp. through direct immunofluorescence and the centrifugal flotation technique, a value of $k = 0.27$ was confirmed. Thus, direct immunofluorescence exhibited greater sensitivity in the diagnosis of both *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* sp., while the combination of more than one laboratory technique was significant, as it tends to be more assertive in the detection of these parasites in aquatic mammals.

Keywords: Protozoa, diagnosis, parasitic diseases, Mustelidae, cetacea, sirenia.

Introdução

Cryptosporidium e *Giardia* são protozoários que a cada dia vêm apresentando uma maior importância na saúde humana e animal, pois além de acometer um grande contingente de hospedeiros (Xiao e Fayer, 2008; Xiao, 2010), estão frequentemente associados a transtornos gastroentéricos (Xiao e Fayer, 2008), especialmente em hospedeiros imunocomprometidos (Xiao e Feng, 2008).

Entretanto, estes parasitos podem cursar de forma assintomática (Xiao e Feng, 2008; Borges et al., 2011; Delpont et al., 2014), ocasionando dificuldades para um diagnóstico preciso. Estas limitações são ainda mais potencializadas quando envolve os mamíferos aquáticos (Measures e Olson, 1999), tendo em vista o comportamento discreto de diversas espécies e o ambiente em que estão inseridos.

Neste sentido, para o diagnóstico destes protozoários é de fundamental importância a utilização de técnicas laboratoriais que permitam a visualização dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* sp. ou ainda a identificação molecular dos referidos agentes etiológicos (Borges et al., 2011; Appelbee et al., 2010).

Considerando o incremento dos relatos destes agentes parasitários acometendo os mamíferos aquáticos (Méndez-Hermida et al., 2007; Delpont et al., 2014) é de grande relevância a identificação de métodos laboratoriais que proporcionem uma boa sensibilidade, praticidade, apresentem baixo custo e seja de fácil execução (Gomes et al., 2004; Cantos et al., 2011).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a utilização de uma técnica imunológica com métodos parasitológicos no diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em mamíferos aquáticos.

Material e Métodos

Foram coletadas 553 amostras fecais e conteúdo intestinal de 15 espécies de mamíferos aquáticos, compreendendo as ordens carnívora (*Lontra longicaudis*, *Pteronura brasiliensis*), cetartiodactyla (*Balaenoptera acutorostrata*, *Grampus griseus*, *Inia geoffrensis*, *Kogia breviceps*, *Kogia sima*, *Peponocephala electra*, *Physeter macrocephalus*, *Sotalia guianensis*, *Stenella attenuata*, *Stenella clymene*, *Ziphius cavirostris*) e sirenina (*Trichechus inunguis*, *Trichechus manatus*).

Este material biológico foi obtido de espécimes mantidos em cativeiro e necropsiados, assim como ocorreu a coleta de amostras fecais frescas encontradas nas áreas de uso de diversas espécies (sítios de defecação, saídas de locas e áreas de alimentação). As atividades foram desenvolvidas no período de 2011 a 2015, nas regiões Norte (Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia) e Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba e Sergipe).

As amostras coletadas foram armazenadas em solução contendo álcool, formol, ácido acético glacial e água destilada (AFA), em proporções sugeridas por Ueno e Gonçalves (1994), devidamente identificadas e encaminhadas para o processamento laboratorial.

Para a identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., utilizou-se a técnica de Kinyoun (Brasil, 1996), enquanto que para a pesquisa de cistos de *Giardia* sp. empregou-se o método de

centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (Appelbee et al., 2010; Bica et al., 2011). Posteriormente, todas as amostras foram submetidas a reação de imunofluorescência direta, conforme as recomendações do Kit Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*, sendo os oocistos e cistos identificados com base na sua forma, tamanho e o padrão da intensidade da fluorescência (Reboredo-Fernández et al., 2015). As amostras foram consideradas positivas, quando um dos testes utilizados, permitiram a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* sp. (Méndez-Hermida et al., 2007; Borges et al., 2011).

Para mensurar a concordância entre as técnicas utilizadas para detecção de cada parasita abordado neste estudo foi utilizada o Índice de Kappa (k), sendo os valores interpretados conforme Everitt (1989). Adicionalmente, com a intenção de comparar os diferentes métodos de diagnósticos utilizados, foi avaliado a sensibilidade, especificidade, prevalência real, prevalência estimada, valor preditivo, positivo, valor preditivo negativo e classificação correta (acurácia) (Thrusfield, 2004), sendo o teste de imunofluorescência direta definido como padrão ouro nestas análises.

Todas as análises estatísticas foram executadas no programa R (R Core Team, 2015), sendo o índice de concordância entre as técnicas de detecção dos parasitos executada no Software irr (Gamer et al., 2012).

Resultados

Entre as espécies de mamíferos aquáticos avaliadas neste estudo, a presença de *Cryptosporidium* spp. foi constatada em *Lontra longicaudis* (15,28%), *Pteronura brasiliensis* (41,66%), *Sotalia guianensis* (9,67%), *Trichechus inunguis* (16,03%) e *Trichechus manatus* (13,79%). Ao que diz respeito a ocorrência de *Giardia* sp., este agente foi identificado em *L. longicaudis* (9,23%), *P. brasiliensis* (29,16%), *Kogia breviceps* (100%), *Kogia sima* (25%), *S. guianensis* (9,67%), *T. inunguis* (3,81%) e *T. manatus* (10,34%). Em determinadas ocasiões observou-se a infecção simultânea destes protozoários, em ocasiões que acometeram *L. longicaudis* (4,45%), *P. brasiliensis* (20,83%), *S. guianensis* (3,22%) e *T. inunguis* (0,76%).

Na avaliação do Índice de Kappa (k), ao que concerne ao diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. por meio do teste de imunofluorescência direta e a técnica de Kinyoun, foi encontrado o valor de $k = 0,86$. Com relação a identificação dos cistos de *Giardia* sp. através da técnica de centrífugo-flutuação e imunofluorescência direta, o valor de k foi de 0,27.

Os valores de sensibilidade, especificidade, prevalência real, prevalência estimada, valor preditivo, positivo, valor preditivo negativo, classificação correta (acurácia) e classificação incorreta para cada agente etiológico analisado, encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1. Avaliação das técnicas laboratoriais utilizadas para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. em mamíferos aquáticos

Agente Etiológico	Técnica	Sensibilidade	Especificidade	Prevalência Real	Parâmetros (%)		Classificação correta (acurácia)	
					Prevalência estimada	Valor preditivo (+) Valor preditivo (-)		
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Kinyoun	57,47	100	15,73	9,04	100	92,64	93,3
	IFD	67,81	100	15,73	10,66	100	94,33	94,93
<i>Giardia</i> sp.	Centrifugo-Flutuação	21,56	100	9,22	1,98	100	92,61	92,76
	IFD	96,07	100	9,22	8,86	100	99,60	99,63

Discussão

A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. nas espécies de mamíferos aquáticos relatadas neste estudo, especialmente os achados acometendo *Lontra longicaudis*, *Pteronura brasiliensis* e *Sotalia guianensis*, assim como a presença de *Giardia* sp. em *L. longicaudis*, *P. brasiliensis*, *T. inunguis* e *T. manatus*, ampliam o contingente de hospedeiros acometidos por estes protozoários.

Estes achados, adicionados às descrições anteriores acerca da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. isolados em mamíferos aquáticos cativos e de vida livre, em outros países (Méndez-Hermida et al., 2007; Appelbee et al., 2010), assim como no Brasil (Borges et al., 2011), pode representar um risco ainda maior para a saúde pública (Fayer, 2004; Thompson, 2004).

As frequências da infecção nas espécies de mamíferos aquáticos estudadas podem estar relacionadas a diferentes fatores como hábitos alimentares, sazonalidade climática, tamanho da amostra, intensidade da contaminação ambiental nos recursos hídricos e ainda a sensibilidade das técnicas de diagnóstico utilizadas (Appelbee et al., 2005; Delport et al., 2014).

Neste sentido, considerando as possíveis variações na sensibilidade das diferentes técnicas laboratoriais, optou em utilizar dois métodos de diagnóstico para cada parasito focado neste estudo. Buscando avaliar a concordância existente entre estes métodos empregados, foi utilizado o índice de Kappa (k) (Everitt, 1989; Thrusfield, 2004).

Na relação estabelecida entre o teste de imunofluorescência direta e a técnica de Kinyoun para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., foi encontrado o $k = 0,86$, sendo considerado uma concordância quase perfeita ou ótima (Thrusfield, 2004). Com relação aos cistos de *Giardia* sp. identificados através da técnica de centrífugo-flutuação e imunofluorescência direta, o valor de k foi de 0,27, neste caso, considerado uma concordância razoável ou por alguns autores, sofrível (Everitt, 1989, Thrusfield, 2004).

Os métodos parasitológicos empregados apresentaram relativa facilidade na preparação dos corantes utilizados. Com a técnica de Kinyoun foram constatadas qualidades relevantes para ser utilizada na rotina laboratorial, considerando a sua boa sensibilidade e o baixo custo, embora tenha apresentado limitações inerentes à morosidade dos procedimentos, durante o preparo do esfregaço e a coloração, existindo ainda a necessidade da microscopia ser realizada em todos os campos da lâmina, sendo requerido um tempo ainda maior para a execução dos procedimentos (Kehl et al., 1995; Ignatius et al., 1997). Por sua vez, o método de centrífugo-flutuação apresentou uma baixa sensibilidade, apresentando assim, eficiência limitada no diagnóstico de *Giardia* sp., quando comparada a técnica de imunofluorescência direta.

Adicionalmente, baseados em princípios imunológicos, a reação de imunofluorescência direta, vêm sendo utilizada empregando anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e *Giardia* marcados com isotiocianato de fluoresceína (Gomes et al., 2004), proporcionando em muitos casos, alta sensibilidade e passível de uso para processamento de um maior número de amostras (Gomes et al., 2004), conforme pode ser constatado nos resultados encontrados neste estudo. Entretanto, apresenta como desvantagem, o elevado custo dos kits comercializados, o que pode representar limitações para a utilização deste método nas avaliações de rotina envolvendo os mamíferos aquáticos.

Neste sentido, a técnica de imunofluorescência direta demonstrou maior sensibilidade tanto no diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. como de *Giardia* sp., sendo relevante a combinação de mais de uma técnica laboratorial empregada, buscando ser mais assertivo na detecção destes parasitos em mamíferos aquáticos.

Referências

- Appelbee, A.J., Thompson, R.C.A., Measures, L.M., Olson, M.E., 2010. *Giardia* and *Cryptosporidium* in harp and hooded seals from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Vet Parasitol.* 173, 19-23.
- Appelbee, A.J., Thompson, R.C.A., Olson, M.E., 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – current status and future needs. *Trends Parasitol.* 21, 370-376.
- Bica, V.C., Dillenburg, A.F., Tasca, T., 2011. Diagnóstico laboratorial da giardiose humana: comparação entre as técnicas de sedimentação espontânea em água e de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco. *Rev. HCPA.* 31, 39-45.
- Borges, J.C.G., Alves, L.C., Faustino, M.A.G., Marmontel, M., 2011. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Antillean manatees (*Trichechus manatus*) and Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*) from Brazil. *J Zoo Wildl Med.* 42, 593-596.
- Brasil, 1996. Ministério da Saúde. Infecções oportunistas por parasitas em AIDS: técnicas de diagnóstico. Brasília, DF
- Cantos, G.A., Galvão, M., Linécio, J., 2011. Comparação de Métodos Parasitológicos tendo como Referencial o Método de Faust para a Pesquisa de Cistos de Protozoários. *NewsLab.* 104, 160-165.

- Delpont, T.C., Asher, A.J., Beaumont, L.J., Webster, K.N., Harcourt, R.G., Power, M.L., 2014. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* occurrence in Australian sea lions (*Neophoca cinerea*) exposed to varied levels of human interaction. *Int J Parasitol.* 3, 269-275.
- Everitt, R.S., 1989. *Statistical Methods for Medical Investigations*. Oxford University Press, New York, Edward Arnold, London, 195 p.
- Fayer, R., 2004. Biology. In: Fayer, R.; Xiao, L. (Eds). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, second ed. CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, FL, 1-42.
- Gamer, M., Lemon, J., Fellows, I., Sing, P., 2012. Irr: Various coefficients of interrater reliability and agreement (Version 0.84) [software] 2012 Available from <http://CRAN.R-project.org/package=irr>.
- Gomes, A.H.S., Kanamura, H.Y., Almeida, M.E., Araujo, A.J.U.S., 2004. Detecção de *Cryptosporidium* em amostras fecais por técnicas de Nested-PCR e comparação com métodos imunológicos e parasitológicos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 63, 255-261.
- Ignatius, R., Eisenblatter, M., Regnath, T., Mansmann, U., Futh, U., Hahn, H., Wagner, J., 1997. Efficacy of different methods for detection of low *Cryptosporidium parvum* oocyst numbers or antigen concentrations in stool specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 732-736.
- Kehl, K.S., Cicirello, H., Havens, P.L., 1995. Comparison of four diferente methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J. Clin. Microbiol.* 33, 416-418.
- Méndez-Hermida, F., Gómez-Couso, H., Romero-Suances, R., Ares-Mazás, E., 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild otters (*Lutra lutra*). *Vet Parasitol.* 144, 153-156.
- Measures, L.N., Olson, M., 1999. Giardiasis in Pinnipeds from Eastern Canada. *J. Wildlife Dis.* 35, 779-782.
- R CORE TEAM, 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reboredo-Fernández, A., Ares-Mazás, E., Martínez-Cedeira, J.A., Romero-Suances, R., Cacciò, S.M., Gómez-Couso, H., 2015. *Giardia* and *Cryptosporidium* in cetaceans on the European Atlantic coast. *Parasitol Res.* 114, 693-698.
- Thompson, R.C., 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.* 126, 15-35.
- Thrusfield, M.V., 2004. *Epidemiologia Veterinária*. Editora Roca, São Paulo. 556 p.
- Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1994. *Manual para Diagnóstico das Helminntoses de Ruminantes*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul

- Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* 124, 80–89.
- Xiao, L., Fayer, R., 2008. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.* 38, 1239–1255.
- Xiao, L., Feng, Y., 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 309–323.

9. CAPÍTULO VI

Utilização da técnica de FLOTAC como um novo método de diagnóstico coproparasitológico em mamíferos aquáticos e a sua comparação com os métodos tradicionais

Capítulo estruturado em formato de artigo e será submetido para o periódico *Marine Mammal Science*.

9. Utilização da técnica de FLOTAC como um novo método de diagnóstico coparasitológico em mamíferos aquáticos e a sua comparação com os métodos tradicionais

Resumo

A escolha inadequada de um método de diagnóstico ou ainda, a opção por técnicas que apresentem baixa sensibilidade e especificidade pode limitar o diagnóstico dos agentes parasitários que acometem os mamíferos aquáticos. Mediante a isto foi desenvolvido este estudo, o qual teve como objetivo avaliar o desempenho da técnica de FLOTAC e a comparação com três métodos tradicionais (Willis, sedimentação e centrifugo-flutuação) utilizados no diagnóstico de parasitos gastrointestinais de mamíferos aquáticos. Para isto foram coletadas 129 amostras fecais provenientes de 12 espécies. Cada amostra foi submetida ao processamento laboratorial utilizando as técnicas de Willis, Hoffman, método de Faust e FLOTAC. Para comparar os diferentes métodos de diagnóstico foi avaliada a sensibilidade, especificidade, prevalência real, prevalência estimada, valor preditivo, positivo, valor preditivo negativo, classificação correta (acurácia) e classificação incorreta. A maior frequência das amostras positivas ocorreu por meio da utilização do FLOTAC (46,51%), em detrimento as técnicas de Hoffman (23,25%), Faust (10,07%) e Willis (6,97%). Nas amostras analisadas observou-se com maior frequência a ocorrência de ovos de Strongylidae e oocistos de Eimeriidae. Considerando os achados deste trabalho, a técnica do FLOTAC apresentou-se mais apropriada do que as demais técnicas utilizadas. Dado a sua eficiência, a mesma apresenta-se fortemente recomendada para as avaliações coparasitológica em mamíferos aquáticos, sem necessidade de processamento das amostras por outros métodos de sedimentação e flutuação.

Palavras-Chave: Doenças Parasitárias, helmintos, protozoários, mamíferos marinhos.

Abstract

The inadequate selection of a diagnostic method, or the selection of techniques that exhibit low sensitivity and specificity, can hinder the diagnosis of parasitic agents in aquatic mammals. Therefore, the aim of the present study was to assess the performance of the FLOTAC technique and compare it with three traditional methods (Willis, sedimentation and centrifugal flotation) that are used to diagnose gastrointestinal parasites in aquatic mammals. To do so, 129 fecal samples were collected from 12 species. Each sample was submitted to the laboratory procedures using the Willis, Hoffman, Faust and Flotac methods. The following measurements were analyzed to

compare the different diagnostic methods: sensitivity; specificity; real prevalence; estimated prevalence; positive predictive value; negative predictive value; correct classification (accuracy) and incorrect classification. The highest frequency of positive samples occurred when using the FLOTAC technique (46.51%), followed by the Hoffman (23,25%), Faust (10,07%) and Willis (6,97%) techniques. In the samples analyzed, there was a notably higher frequency of Strongylidae eggs and Eimeriidae oocysts. Based on the results of the present study, the FLOTAC method was more appropriate than the other techniques used. Due to its effectiveness, this method is strongly recommended for coproparasitological assessments of aquatic mammals, and there is no need to process the samples with other sedimentation and floating methods.

Keywords: parasitic diseases; helminths, protozoa; marine mammals

Introdução

Além de sua importância econômica e sanitária, os parasitos são parte integrante da biosfera (Raga *et al.* 2009), onde em virtude da sua diversidade e mecanismos de ação, estes infectam muitos organismos livres, influenciando a saúde do hospedeiro, tamanho e comportamento de populações, além da dinâmica da cadeia alimentar e estrutura de comunidades (Raga *et al.* 2009).

Contudo, o efeito do parasitismo em mamíferos aquáticos apresenta limitações para o seu real conhecimento, considerando muitas vezes as dificuldades em obter amostras destes animais (Bossart 2001, Borges *et al.* 2011), a compreensão limitada das relações existentes entre os hospedeiros e a biologia dos parasitos, bem como as limitações encontradas para o desenvolvimento de estudos experimentais (Raga *et al.* 1997). Adicionalmente, a escolha inadequada de um método de diagnóstico ou ainda, a opção por técnicas que apresentem baixa sensibilidade e especificidade pode limitar as evidências destes agentes etiológicos (Appelbee *et al.* 2010, Rengifo-Herrera *et al.* 2011, Reboredo-Fernández *et al.* 2015).

Em detrimento a isto, mesmo sendo reconhecida a importância e contribuição de métodos tradicionais para o diagnóstico de parasitos gastrointestinais, como a centrífugo-flutuação (Bando *et al.* 2014), Willis (Willis 1921) e a sedimentação (Bando *et al.* 2014), nos últimos anos foi proposto o uso do FLOTAC, sendo esta uma nova técnica multivalente para a identificação qualitativa e quantitativa destes patógenos (Cringoli *et al.* 2011, Cringoli *et al.* 2013, Maurelli *et al.* 2014).

As pesquisas que vêm sendo conduzidas utilizando o FLOTAC, demonstraram a maior sensibilidade desta técnica, quando comparada aos métodos clássicos e convencionais, sendo estas pesquisas inicialmente direcionadas aos animais domésticos (Cringoli *et al.* 2010, Lima *et al.*

2015) e humanos (Becker *et al.* 2011, Knopp *et al.* 2014), não existindo até então, relatos do uso em mamíferos aquáticos. Em todos os estudos desenvolvidos, a utilização do Flotac apresentou maior eficiência na identificação de ovos ou oocistos (Knopp *et al.* 2009, Lima *et al.* 2015).

Assim, com a intenção de ampliar a capacidade de identificação das enfermidades parasitárias, foi desenvolvido este estudo, o qual teve como objetivo avaliar o desempenho da técnica de FLOTAC e comparação com três métodos tradicionais (Willis, sedimentação e centrifugo-flutuação) utilizados no diagnóstico de parasitos gastrointestinais de mamíferos aquáticos.

Material e Métodos

Foram coletadas 129 amostras fecais e conteúdo intestinal provenientes de 12 espécies de mamíferos aquáticos (Tabela 1), sendo estes de vida livre e mantidos em cativeiro. As coletas do material biológico ocorreram em oito estados do Brasil, contemplando as regiões Norte (Amapá e Rondônia) e Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba e Sergipe), entre 2013 e 2014.

Após a coleta, o material foi acondicionado em frascos contendo solução constituída de álcool, formol, ácido acético glacial e água destilada (AFA), em proporções sugeridas por Ueno e Gonçalves (1994), sendo estas encaminhadas para o processamento laboratorial.

Cada amostra foi submetida ao processamento laboratorial utilizando as técnicas de Willis (Willis 1921), sedimentação espontânea - Hoffman (Hoffman *et al.* 1934), método de Faust utilizando o sulfato de zinco (Cantos *et al.* 2011) e FLOTAC (Cringoli *et al.* 2010). Os ovos e cistos encontrados foram identificados a nível de família.

Para comparar os diferentes métodos de diagnósticos utilizados, foi avaliada a sensibilidade, especificidade, prevalência real, prevalência estimada, valor preditivo, positivo, valor preditivo negativo e classificação correta (acurácia) (Thrusfield 2004), sendo a técnica de Willis definida como padrão ouro nestas análises (Lima *et al.* 2015).

Todos os procedimentos foram submetidos para a avaliação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sendo concedido a licença de Número 33.819-1. Além disto, esta pesquisa foi avaliada e autorizada pela Comissão de Ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco (010/2014).

Tabela 1: Procedência das amostras fecais provenientes das 12 espécies de mamíferos aquáticos.

Ordem	Espécie	Origem da Amostra	Localidade	Total de Amostras
Carnívora - Família Mustelidae	<i>Lontra longicaudis</i>	Locais de descanso, saídas de locais, sítios de defecação, reabilitação	AP, RO, SE	94
	<i>Pteronura brasiliensis</i>	Locais de descanso, saídas de locais, sítios de defecação	RO	4
Cetartiodactyla	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Necropsia	MA	2
	<i>Grampus griseus</i>	Necropsia	CE	1
	<i>Kogia breviceps</i>	Necropsia	SE	1
	<i>Kogia sima</i>	Necropsia	CE	2
	<i>Peponocephala electra</i>	Necropsia	AL, CE, SE	7
	<i>Physeter macrocephalus</i>	Necropsia	SE	2
	<i>Sotalia guianensis</i>	Necropsia	BA, PB, SE	11
	<i>Stenella attenuata</i>	Necropsia	SE	1
	<i>Stenella clymene</i>	Necropsia	BA	1
Sirenia	<i>Trichechus manatus</i>	Animais de cativeiro; animal reintroduzido; necropsia	CE, SE	3

AL (Alagoas); RO (Rondônia); SE (Sergipe); MA (Maranhão), CE (Ceará).

Resultados

As quatro técnicas utilizadas mostraram-se capazes de permitir a identificação de ovos de helmintos, oocistos e cistos de protozoários gastrointestinais (Tabela 2). Entretanto, a maior frequência das amostras positivas ocorreu por meio da utilização do FLOTAC (46,51%), em detrimento às técnicas de Hoffman (26,35%), Faust (12,40%) e Willis (7,75%).

Nas amostras analisadas observou-se com maior frequência a ocorrência de ovos de Strongylidae e oocistos de Eimeriidae. Em todas as técnicas utilizadas foram constatadas infecções concomitantes, ocasionadas por dois ou três agentes etiológicos diferentes.

Tabela 2. Infecção simples e co-infecção por parasitos gastrointestinais em mamíferos aquáticos

Técnica	Família	Hospedeiros	Frequência Relativa (%)
Willis	Strongylidae	<i>L. longicaudis</i> , <i>P. electra</i>	3,10 (04/129)
	Eimeriidae	<i>L. longicaudis</i>	1,55 (02/129)
	Diphyllobothriidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Opisthorchiidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Diphyllobothriidae + Strongylidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
Hoffman	Strongylidae	<i>L. longicaudis</i> , <i>P. electra</i>	5,42 (07/129)
	Eimeriidae	<i>L. longicaudis</i>	3,87 (05/129)
	Diphyllobothriidae	<i>L. longicaudis</i>	3,10 (04/129)
	Strongylidae + Diphyllobothriidae	<i>L. longicaudis</i>	2,32 (03/129)
	Lernaeidae	<i>L. longicaudis</i>	1,55 (02/129)
	Lernaeidae + Eimeriidae	<i>L. longicaudis</i>	1,55 (02/129)
	Ancylostomatidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Ancylostomatidae + Strongylidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Hexamitidae (<i>Giardia sp.</i>) + Eimeriidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Trichinellidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Diphyllobothriidae + Strongylidae + Kudoidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
Strongylidae + Kudoidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)	
Diphyllobothriidae + Strongylidae + Eimeriidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)	
Faust	Eimeriidae	<i>L. longicaudis</i> , <i>S. guianensis</i> , <i>S. attenuata</i>	7,75 (10/129)
	Hexamitidae (<i>Giardia sp.</i>)	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Eimeriidae + Strongylidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Hexamitidae (<i>Giardia sp.</i>) + Lernaeidae	<i>L. longicaudis</i> , <i>P. electra</i>	0,77 (01/129)
FLOTAC	Eimeriidae	<i>L. longicaudis</i> , <i>P. brasiliensis</i> , <i>K. sima</i> , <i>P. electra</i> , <i>S. guianensis</i> , <i>S. clymene</i> , <i>T. manatus</i>	19,37 (25/129)
	Strongylidae	<i>L. longicaudis</i> , <i>S. guianensis</i>	6,97 (09/129)
	Eimeriidae + Strongylidae	<i>L. longicaudis</i> , <i>P. electra</i> , <i>S. guianensis</i>	3,10 (04/129)
	Ancylostomatidae	<i>L. longicaudis</i> , <i>P. brasiliensis</i>	1,55 (02/129)
	Ancylostomatidae + Eimeriidae	<i>L. longicaudis</i>	2,32 (03/129)
	Eimeriidae + Lernaeidae	<i>L. longicaudis</i> , <i>B. acutorostrata</i>	1,55 (02/129)
	Ichthyophthiriidae	<i>L. longicaudis</i> , <i>P. brasiliensis</i>	1,55 (02/129)
	Lernaeidae	<i>L. longicaudis</i>	1,55 (02/129)
	Ancylostomatidae + Strongylidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Ancylostomatidae + Trichinellidae + Strongylidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Ancylostomatidae + Opisthorchiidae + Lernaeidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Diactophymatidae + Eimeriidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Diactophymatidae + Gyrodactylidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (1/129)
	Eimeriidae + Myxobolidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Eimeriidae + Ichthyophthiriidae + Lernaeidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Kudoidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Opisthorchiidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
	Strongylidae + Lernaeidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)
Strongylidae + Gyrodactylidae + Lernaeidae	<i>L. longicaudis</i>	0,77 (01/129)	

De acordo com os valores de sensibilidade, especificidade, prevalência real, prevalência estimada, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e classificação correta (acurácia), pode ser observada uma maior eficácia na técnica de FLOTAC (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação das técnicas de Willis, Hoffman, Faust and FLOTAC no diagnóstico dos parasitos gastrointestinais de mamíferos aquáticos.

Técnicas	Família	Parâmetros (%)						Acurácia
		Sensibilidade	Especificidade	Prevalência Real	Prevalência Estimada	Valor Preditivo (+)	Valor Preditivo (-)	
Willis	Strongylidae	15.62	100	24.80	3.87	100	78.22	79.06
	Eimeriidae	4.4	100	34.88	1.55	100	66.14	66.66
	Diphyllobothriidae	18.18	100	8.52	1.55	100	92.91	93.02
	Opisthorchiidae	33.33	100	2.32	0.77	100	98.43	98.44
Hoffman	Strongylidae	43.75	100	24,80	10,85	100	84,34	86,04
	Eimeriidae	20	100	34.88	6.97	100	70	72.09
	Diphyllobothriidae	81.81	100	8.52	6.97	100	98.33	98.44
	Lernaeidae	33.33	100	9.30	3.10	100	93.6	93.79
	Ancylostomatidae	22.22	100	6.97	1.55	100	94.48	94.57
	Hexamitidae	33.33	100	2.32	0.77	100	98.43	98.44
	Trichinellidae	50	100	1.55	0.77	100	99.21	99.22
	Kudoidae	100	100	1.55	1.55	100	100	100
Faust	Strongylidae	3.12	100	24,80	0,77	100	75,78	75,96
	Eimeriidae	24.44	100	34.88	8.52	100	71.18	73.64
	Lernaeidae	8.33	100	9.30	0.77	100	91.40	91.47
	Hexamitidae	66.66	100	2.32	1.55	100	99.21	99.22
FLOTAC	Strongylidae	53.12	100	24.80	13.17	100	86.60	88.37
	Eimeriidae	82.22	100	34.88	26.68	100	91.30	93.79
	Opisthorchiidae	66.66	100	2.32	1.55	100	99.21	99.22
	Lernaeidae	58.33	100	9.30	5.42	100	95.90	96.12
	Ancylostomatidae	88.88	100	6.97	6.20	100	99.17	99.22
	Trichinellidae	50	100	1.55	0.77	100	99.21	99.22
	Kudoidae	50	100	1.55	0.77	100	99.21	99.22
	Ichthyophthiriidae	100	100	1.55	100	100	100	100
	Diactophymatidae	100	100	1.55	100	100	100	100
	Gyrodactylidae	100	100	1.55	100	100	100	100
	Myxobolidae	100	100	0.77	0.77	100	100	100

Discussão

Ainda que tenha ocorrido o diagnóstico dos diferentes agentes parasitários por meio das quatro técnicas utilizadas, observou-se uma maior frequência de amostras positivas, pelo método de FLOTAC, assim como por meio deste método, foi constatado uma maior diversidade dos parasitos identificados. Resultados semelhantes foram reportados em praticamente todos os estudos desenvolvidos com parasitoses de espécies domésticas e de humanos (Cringoli *et al.* 2010, Becker *et al.* 2011, Knopp *et al.* 2014, Lima *et al.* 2015).

Diferenças existentes entre metodologias das técnicas aqui utilizadas, particularmente a densidade das soluções empregadas, presença de impurezas, distorção nas estruturas dos cistos/oocistos/ovos e a carga parasitária do hospedeiro são alguns dos prováveis fatores que podem ter influenciado nos diversos resultados coproparasitológicos, conforme reportados em outros estudos que avaliaram as técnicas laboratoriais empregadas no diagnóstico de endoparasitas (Dubey 1993, Souza-Dantas *et al.* 2007).

Desta forma, tendo em vista as limitações que uma determinada técnica laboratorial pode apresentar, torna-se relevante a escolha de um método seguro e eficiente. Além disso, o diagnóstico coproparasitológico das parasitoses gastrointestinais ainda é o recurso laboratorial mais utilizado, por ser de fácil execução e baixo custo (Souza-Dantas *et al.* 2007).

Diante destas premissas para a escolha das técnicas laboratoriais empregadas no diagnóstico de helmintoses gastrointestinais de peixes-bois marinhos, Borges *et al.* (2004) mesmo utilizando os métodos de exame direto, Willis, Hoffman e coprocultura, não identificaram a presença de ovos ou larvas de helmintos. Estas técnicas laboratoriais vêm sendo utilizadas em diversas pesquisas envolvendo as enfermidades parasitológicas em outras espécies de mamíferos aquáticos (Torres *et al.* 2004; Uchôa *et al.* 2004), porém ainda que estes métodos tradicionais façam parte da rotina laboratorial, apresentam limitações significativas para um diagnóstico apropriado (Cantos *et al.* 2011).

Como forma de minimizar estas limitações encontradas pelas técnicas de diagnóstico que estão sendo utilizados nos estudos contemplando os mamíferos aquáticos, têm sido realizadas combinações de diferentes métodos de diagnóstico coproparasitológico (Torres *et al.* 2004, Uchôa *et al.* 2004).

Estas estratégias vêm sendo relevantes ao ser considerado a variabilidade morfológica e biológica apresentada pelos parasitos (Mendes *et al.* 2005) e a especificidade que determinadas técnicas apresentam em identificar apenas os ovos ou cistos que sedimentaram ou encontram-se na superfície da solução utilizada (Cantos *et al.* 2011). Entretanto, isto acarreta em mais custos e tempo para a realização do diagnóstico laboratorial.

Por sua vez, tendo em vista os resultados obtidos neste estudo, através da técnica de FLOTAC, foi possível diagnosticar ovos de helmintos, oocistos e cistos de protozoários. A referida técnica, apresenta alta sensibilidade e pode proporcionar em até 10 vezes a capacidade de identificação de ovos e cistos de diferentes parasitos (Cringoli *et al.* 2010).

Outra relevância observada com a utilização do FLOTAC, foi a possibilidade de trabalhar com amostras frescas conservadas, permitindo assim uma maior otimização das atividades laboratoriais e segurança para a equipe de laboratório, mediante a exposição destes profissionais ao buscarem o atendimento dos protocolos que recomendam a utilização apenas de amostras fecais frescas (Cringoli *et al.* 2010).

A diversidade dos agentes etiológicos identificados neste estudo, entre outros fatores, encontra-se diretamente relacionada com o grande número de espécies de mamíferos aquáticos dos quais as amostras foram obtidas, os diferentes habitats utilizados, comportamento alimentar, idade e condição imunológica do hospedeiro (McCarthy e Moore 2000, Fahrion *et al.* 2011). As famílias destes parasitos identificados, de forma semelhante foram também reportados em outros estudos envolvendo os mustelídeos (Hoberg *et al.* 1997, Torres *et al.* 2004, Uchôa *et al.* 2004, Alarcon 2006) e cetáceos (Hughes-Hanks *et al.* 2005, Altieri *et al.* 2007, Reboredo-Fernández *et al.* 2015).

Considerando os achados deste trabalho, a técnica do FLOTAC apresentou-se mais apropriada do que as demais técnicas utilizadas. Dado a sua eficiência, a mesma apresenta-se fortemente recomendada para as avaliações coproparasitológicas em mamíferos aquáticos, sem necessidade de processamento das amostras por outros métodos de sedimentação e flutuação.

Referências Bibliográficas

Alarcon, D. F. 2006. Estudos de parasitas intestinais de *Lontra longicaudis* (Olfers, 1818) (Carnivora, Mustelidae) em riacho e lagoa do distrito de Sousas/Campinas-SP. Dissertação de Mestrado. Universidade de Campinas. São Paulo. 51 p.

Altieri, B. L., D. A. Viana, A. C. O. Meirelles. 2007. Isolation of *Giardia* sp. from an estuarine dolphin (*Sotalia guianensis*) in Ceará State, Northeastern Brazil. Latin American Journal of Aquatic Mammals 6: 113-116.

Appelbee, A. J., R. C. A. Thompson, L. M. Measures, *et al.* 2010 *Giardia* and *Cryptosporidium* in harp and hooded seals from the Gulf of St. Lawrence, Canada. Veterinary Parasitology 173: 19-23.

- Bando, M., I. V. Larkin, S. D. Wright, *et al.* 2014. Diagnostic stages of the parasites of the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*. *Journal of Parasitology* 100:133-138.
- Becker, S. L., L. K. Lohourignon, B. Seich, *et al.* 2011. Comparison of the Flotac-400 Dual Technique and the Formalin-Ether Concentration Technique for Diagnosis of Human Intestinal Protozoan Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 49: 2183-2190.
- Borges, J. C. G., L. C. Alves, M. A. G. Faustino, *et al.* 2011. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Antillean manatees (*Trichechus manatus*) and Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*) from Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 42: 593-596.
- Borges, J. C. G., J. E. Vergara-Parente, R. P. Lima, *et al.* 2004. Helminthose gastrointestinal em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*), no Brasil. In: *11ª Reunión de Especialistas em Mamíferos Acuáticos de América del Sur*, Quito.
- Bossart, G. D. 2001. Manatees. In: Dierauf, L. A., Gulland, F. M. D. (Eds) *Handbook of marine mammals medicine*. CRC Press, Boca Raton, USA. p. 939-958.
- Cantos, G. A., M. Galvão, J. Linécio. 2011. Comparação de Métodos Parasitológicos tendo como Referencial o Método de Faust para a Pesquisa de Cistos de Protozoários. *NewsLab*. 104: 160-165.
- Cringoli, G., L. Rinaldi, M. Albonico, *et al.* 2013. Geospatial (s) tools: integration of advanced epidemiological sampling and novel diagnostics. *Geospatial Health* 7: 399-404.
- Cringoli, G., L. Rinaldi, M. P. Maurelli, *et al.* 2011. *Ancylostoma caninum*: calibration and comparison of diagnostic accuracy of flotation in tube, McMaster and FLOTAC in faecal samples of dogs. *Experimental Parasitology* 128: 32-37.
- Cringoli, G., L. Rinaldi, M. P. Maurelli, *et al.* 2010. Flotac: new multivalente techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols* 5: 503-515, 2010.

Dubey, J. P. 1993. Intestinal protozoa infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 23: 37-55.

Fahrion, A. S., M. Schnyder, B. Wichert, *et al.* 2011. *Toxocara* eggs shed by dogs and cats and their molecular and morphometric species-specific identification: is the finding of *T. cati* eggs shed by dogs of epidemiological relevance? *Veterinary Parasitology* 177: 186-189.

Hoberg, E. P., C. J. Henny, O. R. Hedstrom, *et al.* 1997. Intestinal helminths of river otters (*Lutra canadensis*) from the Pacific Northwest. *Journal of Parasitology* 83: 105-110.

Hoffman, W. A., J. A. Pons, J. L. Janer. 1934. The sedimentation concentration methods in *Schistosomiasis mansoni*. *Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine* 9: 283-289.

Hughes-Hanks, J. M., L. G. Rickard, C. Panuska, *et al.* 2005. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Five Marine Species. *Journal of Parasitology* 91:1255-1228.

Knopp, S., L. Rinaldi, I. S. Khamis, *et al.* 2009. A single Flotac is more sensitive than triplicate kato-katz for the diagnosis of low-intensity soil-transmitted helminth infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103: 347-354.

Knopp, S., N. Salim, T. Schindler, *et al.* 2014. Diagnostic Accuracy of Kato-Katz, Flotac, Baermann, and PCR Methods for the Detection of Light-Intensity Hookworm and *Strongyloides stercoralis* Infections in Tanzania. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 90, 535-545.

Lima, V. F. S., G. Cringoli, L. Rinaldi, *et al.* 2015. A comparison of mini-FLOTAC and FLOTAC with classic methods to diagnosing intestinal parasites of dogs from Brazil. *Parasitology Research* DOI 10.1007/s00436-015-4605-x.

Maccarthy, J., T. A. Moore. 2000. Emerging helminth zoonoses. *International Journal for Parasitology* 30: 1351-1360.

- Maurelli, M. P., L. Rinaldi, S. Alfano, *et al.* 2014. Mini-FLOTAC, a new tool for copromicroscopic diagnosis of common intestinal nematodes in dogs. *Parasite & Vectors* 6: 356.
- Mendes, C. R., A. T. L. S. TEIXEIRA, R. A. T. PEREIRA, *et al.* 2005. A comparative study of the parasitological techniques: kato-katz and coprotest®. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38: 178-180.
- Raga, J. A., J. A. Balbuena, J. Aznar, *et al.* 1997. The impact of parasites on marine mammals: a review. *Parassitologia* 39: 293-296.
- Raga, J. A., M. Fernández., J. A. Balbuena, *et al.* 2009. Parasites. In: Perrin, W. F., B. Wursing, J. G. M. Thewissen. *Encyclopedia of Marine Mammals (Second Edition)*, p. 821-830.
- Reboredo-Fernández, A., E. Ares-Mazás, J. A. Martínez-Cedeira, *et al.* 2015. *Giardia* and *Cryptosporidium* in cetaceans on the European Atlantic coast. *Parasitology Research* 114:693-698.
- Rengifo-Herrera, C., L. M. Ortega-Mora, M. Gómes-Baustista, *et al.* 2011. Detection and characterization of a *Cryptosporidium* isolate from a southern elephant seal (*Mirounga leonina*) from the Antarctic Peninsula. *Applied and Environmental Microbiology* 77:1524-1527.
- Souza-Dantas, L. M., O. P. M. Bastos, B. Brener, *et al.* 2007. Técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco no diagnóstico de helmintoses gastrointestinais de gatos domésticos. *Ciência Rural* 37: 904-906.
- Thrusfield, M. V. 2004. *Epidemiologia Veterinária*. Editora Roca, São Paulo. 556 p.
- Torres, J., C. Feliu, J. Fernández-Morán, *et al.* 2004. Helminth parasites of the Eurasian otter *Lutra lutra* in southwest Europe. *Journal of Helminthology* 78: 353-359.
- Uchôa, T., G. P. Vidolin, T. M. Fernandes, *et al.* 2004. Aspectos ecológicos e sanitários da lontra (*Lontra longicaudis* OLFERS, 1818) na Reserva Natural Salto Morato, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. *Caderno da Biodiversidade* 4: 19-28.

Ueno, H., P. C. Gonçalves. 1994. Manual para Diagnóstico das Helmintoses de Ruminantes. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Willis, H. H. 1921. Simple levitation methods for detection of hookworm ova. Medical Journal of Australia 2: 375-376.

10. CONCLUSÕES GERAIS

- Em mamíferos aquáticos das regiões Norte e Nordeste do Brasil, a presença de *Cryptosporidium* spp. predomina em espécies que utilizam os recursos fluviais. Nos ambientes marinhos, as espécies costeiras são mais acometidas do que as oceânicas. A infecção por *Giardia* sp. é ligeiramente superior nos animais marinhos em relação aos fluviais;
- A infecção por *Pulmonicola cochleotrema* em peixes-bois marinhos na região Nordeste do Brasil ocorre de forma assintomática e sintomática em animais adultos de vida livre;
- Para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp., a técnica de imunofluorescência direta demonstrou maior sensibilidade, porém recomenda-se a combinação de mais de uma técnica laboratorial como forma de ampliar a possibilidade de detecção destes parasitos em mamíferos aquáticos;
- A técnica do FLOTAC apresentou-se mais apropriada para o diagnóstico coproparasitológico em mamíferos aquáticos.