



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**DETECÇÃO DA INFECÇÃO DE ROTAVÍRUS, CORONAVÍRUS,
ENTEROBACTÉRIAS, *Leptospira* spp., *Brucella abortus* E *Toxoplasma
gondii* EM PEIXE-BOI MARINHO (*Trichechus manatus*) EM
CATIVEIRO NO BRASIL**

FERNANDA LÖFFLER NIEMEYER ATTADAMO

Orientador: Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva

RECIFE / PE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

FERNANDA LÖFFLER NIEMEYER ATTADEMO

**DETECÇÃO DA INFECÇÃO DE ROTAVÍRUS, CORONAVÍRUS,
ENTEROBACTÉRIAS, *Leptospira* spp., *Brucella abortus* E *Toxoplasma*
gondii EM PEIXE-BOI MARINHO (*Trichechus manatus*) EM
CATIVEIRO NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva

Recife

2014

Ficha catalográfica

A883d Attademo, Fernanda Loffler Niemeyer
Detecção da infecção de rotavírus, coronavírus,
enterobactérias, *Leptospira* spp., *Brucella abortus* e
Toxoplasma gondii em peixe-boi marinho (*Trichechus
manatus*) em cativeiro no Brasil / Fernanda Loffler
Niemeyer
Attademo. – Recife, 2014.
140 f. : il.
Orientador: Jean Carlos Ramos da Silva.
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento
de Medicina Veterinária, Recife, 2014.
Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).
1. Sirenia 2. Medicina da conservação
3. Soroprevalência 4. Análise de sobrevivência I. Silva,
Jean
Carlos Ramos da, orientador II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**DETECÇÃO DA INFECÇÃO DE ROTAVÍRUS, CORONAVÍRUS,
ENTEROBACTÉRIAS, *Leptospira spp.*, *Brucella abortus* E *Toxoplasma gondii* EM
PEIXE-BOI MARINHO (*Trichechus manatus*) EM CATIVEIRO NO BRASIL**

Tese de doutorado elaborada por

FERNANDA LOFFLER NIEMEYER ATTADEMO

Aprovada em: 21 / 02 / 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. JEAN CARLOS RAMOS DA SILVA

Orientador – Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Dra. FÁBIA DE OLIVEIRA LUNA

Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos – ICMBio

Dr. JOSÉ LUIZ CATÃO DIAS

Departamento de Patologia – USP

Prof. Dr. PROF. FABRÍCIO BEZERRA DE SÁ

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Prof. Dr. LEUCIO CÂMARA ALVES

Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

DEDICATÓRIA

À minha avó **Perola Maria Paganelli Loffler**, pelo exemplo e amor de toda a vida e por me ensinar a não ter preconceitos.

Aos “gorduchos” por sua docilidade e encantamento.

Um dia

Um dia, gastos, voltaremos
A viver livres como os animais
E mesmo tão cansados floriremos
Irmãos vivos do mar e dos pinhais.

O vento levará os mil cansaços
Dos gestos agitados irreais
E há-de voltar aos nossos membros lassos
A leve rapidez dos animais.

Só então poderemos caminhar
Através do mistério que se embala
No verde dos pinhais na voz do mar
E em nós germinará a sua fala.

Sophia de Mello Breyner

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por estar presente nos momentos em que mais precisei e por me ajudar a construir cada tijolo de minha vida.

À **Iemanjá, deusa dos mares**, por sua força e beleza e pela proteção deste ambiente tão lindo e tão negligenciado pelos seres humanos.

Aos peixes-bois, os “gorduchos”, objeto de estudo desta tese, que tanto me inspiraram e me encantam. Agradeço especialmente aos que, infelizmente foram se perdendo no caminho e por razões diversas não sobreviveram. Destes cito Noel e Guape por terem feito parte da minha vida de uma forma especial.

Ao CNPq pelo apoio e incentivo para a realização do meu doutorado e desta tese.

Ao CMA/ICMBio pelo apoio de sempre.

À **minha avó Perola** por todo o amor, carinho e dedicação que sempre me deu e pela paciência em me educar, por ser a pessoa mais incrível que encontrei na vida e em quem me espelho para alcançar cada vitória, mas também que me conforta quando me sinto fragilizada.

À **minha bisavó Annita Niemeyer**, a eterna dindinha, *in memoriam*, nossa grande matriarca e por toda a beleza interior, amor sempre dedicado a toda a família. À saudade que todos os dias nos faz sentir, mas nos inspira a ser melhor cada dia. À **minha avó Anna Maria Niemeyer e meu bisavô Oscar Niemeyer**, ambos *in memoriam*, por investirem no meu futuro e por me ensinarem sobre a vida e aos três pelos encontros de família, agora tão escassos.

Aos meus avôs Walter Attademo e Carlos Alberto Loffler, *in memoriam*, que quando em vida me deram todo o carinho e amor que uma neta pode ter. A saudade deixada será eterna.

À **minha mãe, Paula Paganelli Loffler**, por seu jeito sereno e amoroso, ter conseguido driblar as inúmeras dificuldades que a vida trouxe e ter conseguido criar os três filhos com muito amor.

Ao meu pai, Carlos Eduardo Niemeyer e meus irmãos, Oscar Neto e Anna Claudia Niemeyer e a minha madrastra Luciana Monnerat pelo carinho.

Ao meu irmão Eduardo Loffler por todos os ensinamentos, investimentos e carinhos desprendidos durante toda a minha vida, em especial durante o período em que moramos juntos em Mossoró/RN.

Ao meu “irmão-filho” João Paulo Loffler, por todo o carinho, admiração e companheirismo que sempre dedicou a mim.

Ao meu amor, Andréa, que mudou a cor da minha vida, colorindo meu coração e minha alma. Que com paciência e maturidade esteve ao meu lado nesta importante fase de minha vida e me ensinou que o equilíbrio é a chave do sucesso.

Aos meus tios Lara e Marcus Paganelli Loffler pelo carinho.

À minha tia Ana Elisa Niemeyer Attademo, por ter me apoiado nos momentos difíceis de minha adolescência.

À Sônia Attademo, minha avó de coração pelo carinho de sempre.

Às amigas Carla Marques e Fábria Luna, que mais do que chefes, sempre foram companheiras, confidentes e amigas, me apoiando em todos os momentos. Por formarmos “o trio da conservação” e nos ajudarmos nos momentos difíceis que passamos, seja na vida pessoal ou profissional.

Ao meu orientador, Jean por ter acreditado no nosso projeto e toda a dedicação que sempre teve com os gorduchos.

À Vanessa Ribeiro, Débora Viegas, Leucio Alves, Rinaldo Motta pela ajuda e apoio durante a realização desta tese.

À Renato Maluta, Bianca Zupirolli e Wanderlei Silveira, pelos ensinamentos, apoio, companhia e amizade conquistadas em Campinas/SP

Ao Hebert Soares por toda a ajuda durante as análises na USP, nas discussões da tese e pela certeza de uma amizade construída.

À Solange Gennari, Zenaide Moraes, Gisele Souza, Fábio Gregori e Nara Thiers pelo apoio e ajuda nas análises laboratoriais.

Às amigas Suzane e Lídia, por me “resgatarem”, “resignificarem” meu coração e por trazerem meu amor.

Às minhas “irmãs” Roberta Saraiva, Renata Gonzaga e Mônica Ruz pela amizade eterna e por serem parte de mim. Amizade que está acima do tempo, da distância e do estado de felicidade. As amigas que amo, admiro e respeito muito.

À Vera Lucia, uma sogra, uma amiga e exemplo de vida e personalidade. Pelos momentos deliciosos juntos e a companhia perfeita nas viagens aprendendo sobre a espiritualidade, religião, filosofia e vida.

À Inês Serrano, Augusto, Boaviagem Glaucia Sousa, Iran Normande, Deisi Balensiefer, Patrícia “magra”, Elias, Manuel, “Paulão”, Sergio Pacheco pelo apoio e por serem a “equipe de ouro”.

Aos funcionários, técnicos, tratadores, analistas e parceiros do CMA/ICMBio por me ajudarem nesta caminhada e pela dedicação aos “gorduchos”.

Agradeço as minhas gatinhas Lota (homenagem à “Maria Carlota de Macedo Soares”) e **Gadu** (Homenagem à “Maria Gadu”) por trazerem vida à minha casa se transformando na minha incondicional companhia nesta reta final.

Agradeço a minha enteada canina Frida Kalo por todo o amor, chamegos e passeios. Pelas horas de carinho e por estar presente nestes três últimos anos como importante companhia.

Agradeço às “heranças familiares”: Dos “**Niemeyer**” o amor e respeito aos animais e a natureza, dos “**Paganelli**” o amor ao próximo e a família, dos “**Loffler**” o amor à arte e ao trabalho e aos “**Attademo**” o amor à vida, pela capacidade de começar e recomeçar sempre com a certeza de fazer o melhor e de se apaixonar pela vida e pelas pessoas.

Enfim, agradeço à vida que permanentemente me transforma.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

RESUMO

O peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) é uma das espécies de mamíferos aquáticos mais ameaçadas de extinção no Brasil, tendo o resgate e a reabilitação em cativeiro como importantes ferramentas para a conservação da espécie. O Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos (CMA/ICMBio) é responsável pela reabilitação e soltura destes animais. A instituição utilizou três cativeiros para o manejo da espécie, sendo um para reabilitação e dois localizados em ambiente natural que são utilizados para a readaptação antes da reintrodução. Neste estudo objetivou-se realizar a pesquisa de patógenos selecionados e realizar a análise de sobrevivência em peixe-boi marinho em cativeiro do Brasil. Para isso entre 2003 e 2013 foram colhidas amostras de soros sanguíneos, fezes, swab anal, genital, oral, nasal e de abscessos para e no período de 1987 a 2013 foi calculada a análise de sobrevivência para permanência dos animais, mortalidade e prevalência. Dentre os animais pesquisados, verificou-se como resultados: a presença de rotavírus em 55% (10/18); presença de enterobactérias em 66,7% (20/30) com predominância da *Escherichia coli*; entre as quais foram identificadas *E. coli* patogênicas em 11 amostras de 16 examinadas; nos testes de sensibilidade antimicrobiana realizados 67,4% (426/632) foram resistentes pelo menos a um antibiótico; anticorpos anti-*Leptospira* spp. foram encontrados em 9,2% (2/54) dos animais e os sorovares mais prevalentes foram Australis, Autumnalis, Bataviae, Brastislava e Icterohaemorrhagiae; anticorpos anti-*Brucella abortus* foram encontrados em seis (10,4%) de 58 animais analisados no exame de triagem pelo teste do Antígeno Acidificado e todos foram negativos no exame confirmatório pelo Teste de Fixação de Complemento; anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* foram encontrados em 10,9% (6/55) dos animais; não houve isolamento de *Salmonella* spp. e coronavírus; a análise de sobrevivência indicou uma maior tendência à morte de filhotes e animais jovens até quatro anos de idade e que a reintrodução dos animais ocorreram até oito anos. Verificou-se o sucesso das atividades de reabilitação e a importância para a conservação do peixe-boi marinho, entretanto a detecção dos agentes selecionados demonstrou a necessidade de implementação das medidas de biossegurança e controle da saúde dos animais. Esta é a primeira descrição da presença de rotavírus, da soroprevalência de anticorpos anti-*L. interrogans* e anti-*T. gondii*, da diferenciação das *E. coli* e da análise de sobrevivência para peixe-boi marinho em cativeiro no Brasil.

Palavras-chaves: Sirenia, Medicina da Conservação, soroprevalência, análise de sobrevivência.

ABSTRACT

The manatee (*Trichechus manatus*) is one of the most endangered Brazilian aquatic mammal species. The rescue and rehabilitation in captivity are important tools for the wildlife conservation. The National Center for Research and Conservation of Aquatic Mammals (CMA) is responsible for the rehabilitation and release of these animals. In Brazil, there are three different kinds of manatee captivities, one for rehabilitation and two locates are environmental captivities for animal adaptation in the nature before to release. The present work had the porpoise to analyze the select pathogens and the survival captive manatee in Brazil. From 2003 to 2013 were collected manatee's biological samples, such as serum, feces and rectal, nostrils, oral, nasal and genital swabs.. The animal captive in CRAS/PE during 1987 unitl 2013 was analyzed survival, mortality and prevalence. In animals researched we verified the presence of rotavirus in 55% (10/18), enterobactericeae in 66,7% (20/30) with predominance enteropathogenic *Escherichia coli* in 11 samples of 16 examined. The antibiographical resistance test 67,4% (426/632) was resistance in one or more antibiotic. We found antibodies *Leptospira* spp. in 9.2% (5/54) and the most prevalent serovars were Australis, Autumnalis, Bataviae, Brastislava e Icterohaemorrhagiae, Antibodies *Brucella abortus* with the agglutination test in 10,4% (6/58) however all animals was negative in Complement fixation test being all animals was negative. Antibodies *Toxoplasma gondii* in 10,9% (6/54). *Samonella* spp. and rotavirus were not isolated. Survival analysis indicated a higher tendency to cause the death of calves and younger animal to four years old and the release of the animals to eight years. We confirmed the success of rehabilitation activities and the importance for the manatee conservation, however the positives for the selected agents demonstrated the need to adopt biosecurity measures and health control of the animals. This is the first repot about rotavirus, seroprevalence of toxoplasmosis, leptospirosis and brucellosis, the enteropathogenic *Escherichia coli* and the survival analyses in captive Antillean manatee in Brazil.

Key-word: Sirenia, conservation medicine, survival analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Figura 1	Cinco espécies de sirênios com as respectivas proporcionalidades de tamanho.....	23
Figura 2	Mapa da área de ocorrência de sirênios no Brasil, evidenciando a distribuição (histórica e atual) e os locais de soltura da espécie marinha.	24
Figura 3	Recintos de manutenção de peixe-boi marinho (<i>Trichechus manatus</i>) no CRAS/CMA/ICMBio na Ilha de Itamaracá/PE (CRAS/PE).....	42
Figura 4	Cativeiro de adaptação de peixe-boi marinho (<i>Trichechus manatus</i>) em ambiente natural, rio Mamanguape, Barra de Mamanguape/PB.....	43
Figura 5	Cativeiro de adaptação de peixe-boi marinho em ambiente natural, rio Tatuamunha, Porto de Pedras/AL.....	43
Figura 6	Mapa de limites da APA Costa dos Corais.....	44
Figura 7	Contenção de peixe-boi marinho para a colheita de material biológico.....	46
Figura 8	Esquematisação da veia para colheita de sangue em peixe-boi marinho (<i>Trichechus manatus</i>).....	48
Figura 9	Colheita de sangue da nadadeira peitoral (plexo braquial entre o rádio e a ulna) de peixe-boi marinho (<i>Trichechus manatus</i>) utilizando tubo de colheita à vácuo.....	48
Figura 10	Colheita de amostra para isolamento de enterobactérias em peixe-boi marinho (<i>Trichechus manatus</i>) com swab estéril.....	50
Figura 11	Colheita de fezes da ampola retal de peixe-boi marinho (<i>Trichechus manatus</i>) para análise de agentes virais.....	51
Figura 12	Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético cepa de <i>Escherichia coli</i> , utilizando os resultados da PCR dos genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> e <i>TspE4.C2</i>	57
Figura 13	Processo de amplificação da Reação de Cadeia da Polimerase - PCR de <i>Escherichia coli</i>	58
Figura 14	Teste em disco de sensibilidade de antibióticos.....	60

Figura 15	Etapas do teste sorológico de rosa bengala para a triagem das amostras para <i>Brucella abortus</i>	61
Figura 16	Etapas de realização do Teste de Aglutinação Modificada (MAT) para detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	63
Figura 17	Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA com as cepas de rotavírus amplificados pela Reação de Cadeia da Polimerase (PCR).....	68
Figura 18	Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA para análise de <i>Escherichia coli</i> amplificados pela Reação de Cadeia da Polimerase (PCR).....	72
Figura 19	Função de sobrevivência do tempo de permanência de peixes-bois marinhos (<i>Trichechus manatus</i>) alojados no CRAS-PE, no período de 1987 a 2013.....	76
Figura 20	Função de sobrevivência do tempo de permanência de indivíduos fêmeas e machos de peixes-bois marinhos (<i>Trichechus manatus</i>) alojados no CRAS/PE, no período de 1987 a 2013, diferenciando animais censurados.....	77
Figura 21	Função de sobrevivência do tempo de permanência de peixes-bois marinhos (<i>Trichechus manatus</i>) alojados no CRAS-PE, segundo destino, no período de 1987 a 2013.....	78
Figura 22	Função de sobrevivência do tempo de permanência até o óbito de peixes-bois marinhos (<i>Trichechus manatus</i>) alojados no CRAS/PE, no período de 1987 a 2013.....	79
Figura 23	Função de sobrevivência do tempo de permanência até o óbito de indivíduos fêmeas e machos de peixes-bois marinhos (<i>Trichechus manatus</i>) alojados no CRAS-PE, no período de 1987 a 2013.....	80
Figura 24	Gráfico da destinação dos animais do CRAS/PE considerando os animais atualmente cativos, os animais reintroduzidos e os que vieram à óbito nos três cativeiros do CMA/ICMBio.....	81
Figura 25	Gráfico de sucesso da reabilitação dos animais manejados vivos pelo CMA/ICMBio, demonstrando a destinação distribuídos em animais translocados, animais atualmente em cativeiro e animais que vieram à óbito.....	82

Figura 26	Ciclo de transmissão de leptospirose em peixe-boi marinho (<i>Trichechus manatus</i>).....	95
Figura 27	Ciclo de transmissão de toxoplasmose em peixe-boi marinho (<i>Trichechus manatus</i>).....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Demonstração da diferenciação bioquímica de enterobactérias, com destaque dos parâmetros utilizados nas análises realizadas, exemplificando cinco das enterobactérias utilizadas.....	56
Tabela 2	Nucleotídeos iniciadores (NI), tamanho do produto de amplificação (TPA) e suas respectivas temperaturas de pareamento (TP).....	59
Tabela 3	Enterobactérias encontradas nos swabs de peixes-bois marinhos (<i>Trichechus manatus</i>) cativos do Brasil, demonstrando a quantidade de bactérias isoladas em cada tipo de swab e a quantidade isolada de cada bactéria.....	59
Tabela 4:	Resultados da tentativa de identificação das cepas de <i>Escherichia coli</i> de acordo com os primers utilizados	71
Tabela 5:	Peixes-bois marinhos (<i>Trichechus manatus</i>) em cativeiro adultos soropositivos para anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp., segundo identificação, sexo, data de colheita, origem e sorovares encontrados.	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Agentes etiológicos descritos em sirênios, segundo tipo de diagnóstico e a localização geográfica.....	27
Quadro 2:	Determinação da faixa etária de peixe-boi marinho (<i>Trichechus manatus</i>) dividido em dias e meses.....	44
Quadro 3:	Descrição das condições dos peixes-bois marinhos (<i>Trichechus manatus</i>) de acordo com a localização em cativeiro.....	45
Quadro 4:	Valores de avaliação de estresse dos peixes-boi marinhos (<i>Trichechus manatus</i>) manejados, com pontuações baseadas nos sinais vitais.....	47
Quadro 5:	Descrição do primer VP6 utilizado para a detecção do rotavírus.....	53
Quadro 6:	Descrição do primer utilizado para a detecção do coronavírus.....	54
Quadro 7:	Descrição do primer CV2 utilizado para a detecção do coronavírus.....	54

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AL	Alagoas
APA	Área de proteção ambiental
AQUASIS	Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos
CE	Ceará
CMA	Centro Mamíferos Aquáticos
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
CRAS	Centro de Reabilitação de Animais Silvestres
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IMA	Instituto Mamíferos Aquáticos
IUCN	<i>International Union for the Conservation of Nature</i>
MMA	Ministério do Meio Ambiente
PB	Paraíba
PE	Pernambuco
REMANE	Rede de Encalhe e Monitoramento de Mamíferos Aquáticos do Nordeste do Brasil
RN	Rio Grande do Norte
RT	Transcriptase reversa
SISBIO	Sistema de autorização e informação em biodiversidade
UC	Unidade de Conservação
UERN	Universidade Estadual do Rio Grande do Norte
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
USP	Universidade de São Paulo
UNICAMP	Universidade de Campinas
PCR	Reação em cadeia da polimerase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVOS	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1. TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE SIRÊNIOS.....	22
2.2 CONSERVAÇÃO DE SIRÊNIOS.....	24
2.3 MANEJO E REABILITAÇÃO DE PEIXE-BOI MARINHO (<i>Trichechus manatus</i>, Linnaeus, 1758).....	26
2.4 PATÓGENOS E DOENÇAS QUE PODEM ACOMETER OS PEIXES-BOIS MARINHOS.....	28
2.4.1 Agentes Virais.....	28
2.4.1.1 <i>Rotavírus</i>	29
2.4.1.2 <i>Coronavírus</i>	30
2.4.2 Agentes Bacterianos.....	31
2.4.2.1 <i>Enterobactérias</i>	31
2.4.2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	31
2.4.2.1.2 <i>Salmonella</i> spp.....	32
2.4.2.2 <i>Teste de Sensibilidade Antimicrobiana</i>	34
2.4.2.3 <i>Leptospira</i> spp.....	35
2.4.2.4 <i>Brucella</i> spp.....	36
2.4.3 Agente Parasitário.....	38
2.4.3.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	38
2.5 ANÁLISE DE SOBREVIDA DE PEIXE-BOI MARINHO EM CATIVEIRO.....	40
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 ÁREA DE ESTUDO.....	41
3.2 ANIMAIS.....	44
3.3 CONTENÇÃO E COLHEITA DE AMOSTRAS.....	45
3.4 PROCESSAMENTO LABORATORIAL.....	50
3.4.1 Pesquisa de Agentes Virais.....	51
3.4.1.1 <i>Rotavírus</i>	52
3.4.1.2 <i>Coronavírus</i>	53

3.4.2 Pesquisa de Agentes Bacterianos.....	55
3.4.2.1 Enterobactérias.....	55
3.4.2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	55
3.4.2.1.2 <i>Salmonella</i> spp.....	59
3.4.2.2 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana.....	60
3.4.3 Exames sorológicos.....	60
3.4.3.1 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp.....	60
3.4.3.2 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Brucella</i> spp.....	61
3.4.3.3 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	62
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
3.5.1 Análise de sobrevida.....	64
3.5.1.1 Permanência dos Peixes-bois Marinhos no CRAS-PE.....	64
3.5.1.2 Mortalidade de animais no CRAS-PE.....	65
3.5.2 Estudos de prevalência.....	65
4 RESULTADOS.....	67
4.1 Pesquisa de Agentes Virais.....	67
4.1.1 Rotavírus.....	67
4.1.2 Coronavírus.....	67
4.2 Pesquisa de Agentes Bacterianos.....	68
4.2.1 Enterobactérias.....	68
4.2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	70
4.2.1.2 <i>Salmonella</i> spp.....	72
4.2.2 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana.....	72
4.3 Exames Sorológicos.....	73
4.3.1 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp.....	73
4.3.2 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Brucella</i> spp.....	75
4.3.3 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	75
4.4 Análise de sobrevida.....	75
4.4.1 Permanência dos Peixes-Bois Marinhos no CRAS-PE.....	75
4.4.2 Mortalidade dos animais no CRAS-PE.....	78
5 DISCUSSÃO.....	83
5.1 Pesquisa de Agentes Virais.....	86
5.1.1 Rotavírus.....	86

5.1.2 Coronavírus.....	87
5.2 Pesquisa de Agentes Bacterianos.....	88
5.2.1 Enterobactérias.....	88
5.2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	89
5.2.1.2 <i>Salmonella</i> spp.....	91
5.2.2 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana.....	92
5.3 Exames sorológicos.....	93
5.3.1 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp.....	93
5.3.2 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Brucella</i> spp.....	96
5.3.3 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	97
5.4 Análise de sobrevivência.....	100
6. CONCLUSÃO	102
7. REFERÊNCIAS.....	104
8. APÊNDICE.....	128
9. ANEXO.....	140

1 INTRODUÇÃO

Os mamíferos que vivem exclusivamente ou em grande parte do ciclo de vida na água, independentemente da presença ou ausência de salinidade e que realizam atividades como reprodução e alimentação nesse ambiente são denominados mamíferos aquáticos. Os animais que apresentam estas características são de três grupos principais: pinípedes, cetáceos e sirênios (HANKE e DEHNHARDT, 2013). Nestes grupos existem características morfológicas, biológicas e ecológicas que os diferem entre si, possuindo em comum somente os hábitos aquáticos e com isso a suscetibilidade a agentes patogênicos presentes no meio em que vivem (DIERAUF e GULLAND, 2001).

A Ordem Sirenia está entre as mais ameaçadas de extinção e é dividida em duas famílias: Dugongidae e Trichechidae, com quatro espécies ainda viventes: dugongo (*Dugong dugon* MÜLLER, 1776), peixe-boi africano (*Trichechus senegalensis*), peixe-boi amazônico (*Trichechus inunguis* Natterer, 1883) e o peixe-boi marinho (*Trichechus manatus* Linnaeus, 1758), este subdividido em duas subespécies, peixe-boi marinho das Antilhas (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758) e peixe-boi da Flórida (*Trichechus manatus latirostris* Harlan, 1824) (REEP e BONDE, 2006). No Brasil, ocorrem duas destas espécies, o peixe-boi amazônico e o peixe-boi marinho (LUNA, 2013).

A Medicina da Conservação vem crescendo nos últimos anos e para que tenha efetividade baseia-se na tríade que compõem a saúde ecológica: saúde dos ecossistemas, saúde animal e saúde humana (MANGINI e SILVA, 2007). Os animais selvagens cativos apresentam grande convívio com o ser humano e por esta razão são suscetíveis a patógenos que não são encontrados quando em ambiente natural (CUBAS, SILVA e CATÃO-DIAS, 2007). A relação entre os profissionais que lidam diretamente com estes animais possui como um dos pontos estratégicos o estabelecimento de um adequado manejo e a promoção da saúde animal. Neste enfoque, a investigação com base na epidemiologia das doenças em espécies selvagens em cativeiro e o possível impacto de agentes etiológicos tornam-se importantes para a saúde (CATÃO-DIAS, 2008).

O Protocolo de Reintrodução de Peixe-Boi Marinho (LIMA et al., 2007) considera como critérios de soltura dos animais a idade, aceitação a dieta natural e o prontuário médico veterinário, no qual deve constar o resultado negativo para determinadas doenças e patógenos,

entre eles, toxoplasmose, leptospirose, brucelose, doenças virais e enterobactérias. No entanto, até o presente momento não se tem conhecimento do caráter epidemiológico destas doenças para os peixes-bois marinhos cativos do Brasil.

A investigação epidemiológica destas doenças e dos patógenos que acometem os peixes-bois marinhos em cativeiro pode gerar dados essenciais para o planejamento de medidas preventivas e adequar o protocolo de biossegurança e de conduta médico veterinária de acordo com as principais prevalências e incidências. Além disso, estas investigações podem direcionar as ações da equipe médica veterinária para procedimentos preventivos, sem que tais medidas interfiram no comportamento, na saúde ou resistência do animal a determinadas doenças ou patógenos, inclusive aumentando a sua longevidade (DIERAUF e GULLAND, 2001; CATÃO-DIAS, 2008).

Apesar do *status* preocupante na conservação das espécies de peixes-bois, os dados referentes aos sirênios, em especial a biologia e saúde do peixe-boi marinho no Brasil ainda são escassos (LUNA e PASSAVANTE, 2010), limitando-se a pesquisas e relatos sobre bactérias do trato respiratório superior (VERGARA-PARENTE et al., 2003a.), um caso fatal de salmonelose (VERGARA-PARENTE et al., 2003b), infecção por *Cryptosporidium* spp. (BORGES et al., 2009) e em trabalhos de revisão sobre a criptosporidiose (BORGES, ALVES e FAUSTINO, 2007) e sobre doenças em geral (ROSAS e PIMENTEL, 2003; D'FFONSECA-NETO e VERGARA-PARENTE, 2007).

Desta forma, investigações epidemiológicas de patógenos e de zoonoses como a toxoplasmose, leptospirose, brucelose, salmonelose, colibacilose e rotavírus tornam-se de extrema importância de serem realizadas, uma vez que o conhecimento atual sobre a espécie é baseado principalmente em estudos realizados com o peixe-boi marinho da Flórida.

Além disso, o elevado número de exemplares de peixes-bois marinhos existentes em cativeiro no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CMA/ICMBio) localizado na Ilha de Itamaracá, PE, pode proporcionar a investigação do perfil sanitário das infecções e doenças comuns à espécie e auxiliar na melhoria das ações de manejo e de biossegurança, com vistas à conservação da espécie.

1.1 OBJETIVOS

GERAL

- a) Realizar a investigação epidemiológica de patógenos selecionados e determinar a soroprevalência de toxoplasmose, leptospirose e brucelose em peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) mantidos em cativeiro no Brasil.

ESPECÍFICOS

- a) Realizar o isolamento e a identificação de enterobactérias, rotavírus e coronavírus.
- b) Testar a resistência antimicrobiana das enterobactérias isoladas.
- c) Detectar os patótipos e agrupamento filogenético de *Escherichia coli* nas amostras isoladas.
- d) Determinar a ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, anti-*Leptospira* spp. e anti-*Brucella* spp.
- e) Verificar a função de sobrevivência dos peixes-bois marinhos relacionados à mortalidade e a permanência no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CMA/ICMBio), Ilha de Itamaracá, PE.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE SIRÊNIOS

A Ordem Sirenia (ILLIGER, 1811) teve sua origem no Paleoceno, na região da Jamaica, onde provavelmente ocorreu a divisão a partir de um animal identificado como *Pezosiren portelli* (UHEN, 2007). No entanto, esta espécie vivia entre o ambiente terrestre e aquático e, com a evolução passou a viver somente no meio aquático (REEP e BONDE, 2006). Na Ordem Sirenia existe cinco espécies divididas em duas famílias: Dugongidae e Trichechidae (Figura 1). A família Dugongidae possuía duas espécies, sendo uma já extinta, a vaca-marinha de Steller (*Hydrodamalis gigas* ZIMMERMAN, 1780), restando o dugongo (*Dugong dugon* MÜLLER, 1776). A família Trichechidae possui três espécies: peixe-boi da África (*Trichechus senegalensis* Link, 1795), peixe-boi amazônico (*Trichechus inunguis* Natterer, 1883) e peixe-boi marinho (*Trichechus manatus* Linnaeus, 1758). Esta última espécie marinha apresenta duas subespécies: peixe-boi das Antilhas (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758) e peixe-boi da Florida (*Trichechus manatus latirostris* Harlan, 1824) (D'FFONSECA NETO e VERGARA-PARENTE, 2007)

O Brasil possui duas espécies de peixes-bois, sendo o peixe-boi marinho com a distribuição geográfica desde o nordeste do Brasil até a América Central (LUNA, 2013) e com pontos de descontinuidade em toda a área de distribuição (LUNA et al., 2012) (Figura 2) e o peixe-boi amazônico que ocorre na bacia amazônica. Na região da Ilha de Marajó há relato da presença de animais híbridos de ambas as espécies, no entanto os estudos genéticos em relação a este assunto ainda são escassos, sendo necessárias maiores análises (LUNA, 2013).

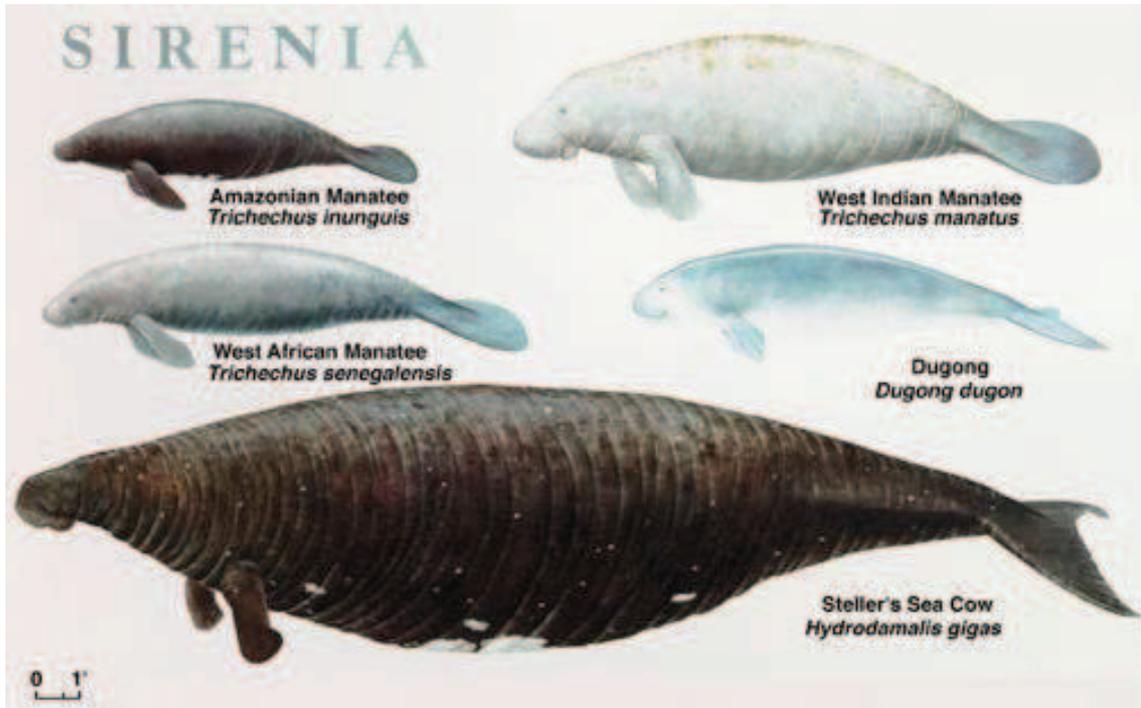


Figura 1: Cinco espécies de sirênios com as respectivas proporcionalidades de tamanho. No sentido canto superior esquerdo ao inferior, o Peixe-boi amazônico, Peixe-boi marinho da Florida, Peixe-boi africano, o Dugongo e a Vaca marinha de Steller.

Fonte: *National Marine Educators Association* (1989).

Estes animais são mundialmente conhecidos como *manatee* ou *manati* (REEP e BONDE, 2006). No Brasil o seu nome popular é “peixe-boi”, possuindo nomes indígenas como *Guaraguá* ou *Guarabá* em tupi yuarauá (FERREIRA, 1986) e *Igarakuê* em Tupi-guarani.

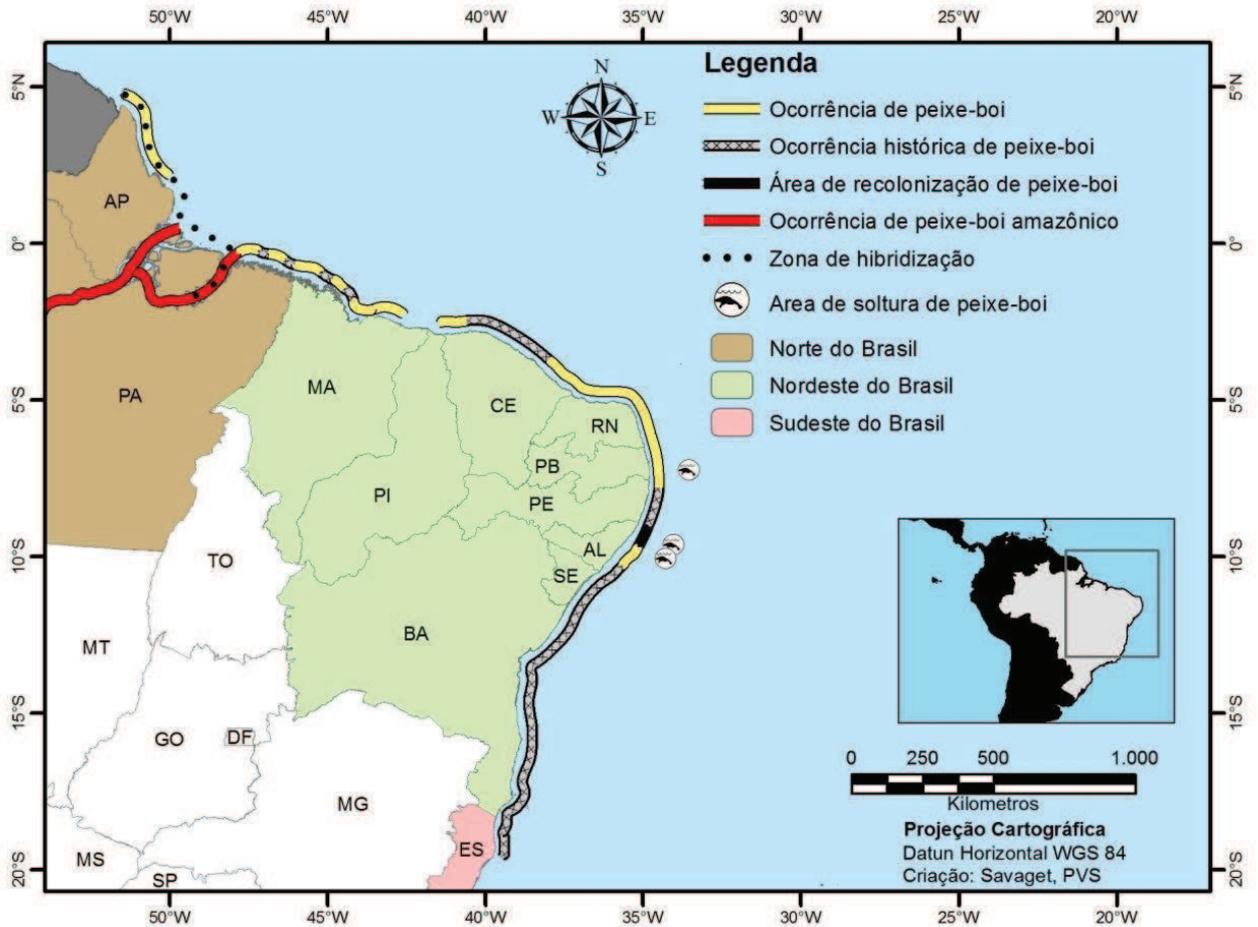


Figura 2: Mapa da área de ocorrência de sirênios no Brasil, evidenciando a distribuição (histórica e atual) e os locais de soltura da espécie marinha.

Fonte: Luna (2013).

2.2 CONSERVAÇÃO DE SIRÊNIOS

As causas para a diminuição populacional dos sirênios são variadas para cada espécie, assim como entre as áreas de ocorrência. A vaca-marinha de Steller, por exemplo, ocorria na região do Alasca e Rússia e apenas 27 anos após sua descoberta a espécie foi extinta devido às ações antrópicas como a caça indiscriminada (REEP e BONDE, 2006). Assim como a vaca marinha, as espécies brasileiras também sofreram grande exploração de caça no passado, sendo que hoje isto persiste ainda para a espécie amazônica (ROSE, 2008). Entretanto, se a caça vem deixando de ser o grande algoz da espécie marinha, outras causas em sua grande maioria em decorrência das atividades humanas (BEST, 1984; BECK e BARROS, 1991), levou o peixe-boi marinho a constar como vulnerável a extinção, na lista

vermelha das espécies ameaçadas, da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) (CHIARELLO et al., 2008; IUCN, 2013).

Estas interferências antropogênicas vêm levando a um crescente número de encalhes (PARENTE, PARENTE e LIMA, 2004; GERACI e LOUNSBURY, 2005) relacionados muitas vezes a perda do habitat devido à degradação ambiental ou ingestão de lixo (SILVA e MARMONTEL, 2009). O aumento do número de embarcações leva também a um maior risco de ferimentos (BORGES, VERGARA-PARENTE e ALVITE 2007), além de afastar a espécie da área de uso normal. Estes fatores somados e a contínua modificação da costa, seja ela de origem física, acústica, visual ou química, contribuem, nos dias atuais, para aumentar os riscos para a sobrevivência da espécie nas áreas costeiras (BAUER et al., 2003; BAUER et al., 2008).

Entre as causas naturais que levaram os sirênios à ameaça de extinção estão a lenta reprodução da espécie, seu comportamento dócil, que permite a aproximação de seres humanos, e a suscetibilidade a serem acometidos por doenças infecciosas (BOSSART et al., 2002; RECTOR et al., 2004; REEP e BONDE, 2006; BOSSART, 2007).

Apesar do incremento de pesquisas com peixe-boi nos últimos anos, ainda são escassas as informações quanto à ecologia, saúde e biologia da espécie (IUCN, 2013). No Brasil, o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CMA/ICMBio) é o centro de pesquisa responsável pela conservação da espécie e possui conhecimento e excelência no manejo de peixe-boi em cativeiro. De acordo com a Portaria do ICMBio N. 78, de 3 de setembro de 2009, os objetivos deste centro são realizar pesquisas científicas e ações de manejo para conservação e recuperação de espécies ameaçadas de mamíferos aquáticos, assim como atuar na conservação de espécies migratórias, na conservação da biodiversidade dos ecossistemas recifais, estuarinos e de manguezais, e auxiliar no manejo das Unidades de Conservação federais marinhas, costeiras e da bacia Amazônica.

2.3 MANEJO E REABILITAÇÃO DE PEIXE-BOI MARINHO (*Trichechus manatus*, Linnaeus, 1758)

O manejo e reabilitação de animais silvestres ameaçados de extinção é uma importante ferramenta na conservação destas espécies, num processo que antecede a soltura destes espécimes em ambiente natural. No entanto, a passagem destes animais em cativeiro se torna risco potencial de transmissão de doenças e patógenos em diferentes cenários, desde a transmissão intraespecífica entre animais que passaram e que não passaram por cativeiro, quanto a transmissão interespecífica (CATÃO-DIAS, 2003). A manutenção destes animais com o pressuposto de reintrodução cria quatro possíveis cenários de transmissão de doenças: transmissão de doenças dos animais reintroduzidos para os nativos, introdução de novos agentes patogênicos dos animais recém chegados no cativeiro, transmissão de doenças dos animais silvestres aos domésticos e dos animais domésticos aos silvestres (CATÃO-DIAS, 2008).

Os animais silvestres, em geral, podem mascarar sinais clínicos e por isso se torna fundamental a padronização e realização de exames antes das reintroduções à natureza (MARVULO, 2007).

De acordo com protocolos nacionais e internacionais o peixe-boi antes de ser reintroduzido necessita se submeter a uma avaliação médica veterinária que inclui análise de parâmetros como a idade do resgate, tempo de cativeiro, sexo e realização de exames clínicos minuciosos, entre eles hemograma completo, exames sorológicos para toxoplasmose, brucelose e neosporose e análises bacteriológicas de amostras de swab retal e nasal (REEP e BONDE, 2006; LIMA, ALVITE e VERGARA-PARENTE, 2007). Estes diagnósticos têm o objetivo de evitar a introdução de patógenos em indivíduos que, em condições normais na natureza nunca teriam contato, fato que poderia gerar problemas para a conservação de qualquer espécie de animal silvestre (PRIMACK e RODRIGUES, 2001). Por outro lado, os animais selvagens cativos, por permanecerem em recintos e em contato com água contaminada, possuem maiores probabilidades de serem infectados com patógenos (ANDRIOLO, 2007; D’AFFONSECA NETO e VERGARA-PARENTE, 2007). O Quadro 1 apresenta os agentes etiológicos, de acordo com os diagnósticos realizados, descritos nas três espécies de sirênios.

Agente Etiológico	Tipo de diagnóstico	Espécie*	Local	Referência
<i>Toxoplasma gondii</i>	MAT	<i>Trichechus manatus</i>	Belize	SULZNER et al. (2012)
<i>Leptospira</i> spp.	SAM	<i>Trichechus manatus</i>	Belize	SULZNER et al. (2012)
	SAM	<i>Trichechus inunguis</i>	Brasil	MATHEWS et al. (2012)
Papilomavírus	PCR	<i>Trichechus manatus</i>	Flórida, EUA.	BOSSART (2007)
<i>Cryptosporidium</i> sp.	Imunofluorescência	<i>Trichechus manatus</i>	Brasil.	BORGES, VERGARA-PARENTE e FAUSTINO (2009).
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Imunofluorescência	<i>Dugong dugon</i>	Austrália	MORGAN et al. (2000)
Bactérias de diversas espécies	Cultura	<i>Trichechus manatus</i>	Brasil.	VERGARA-PARENTE et al. (2003a).
<i>Salmonella</i> spp.	Teste bioquímico	<i>Trichechus manatus</i>	Brasil.	VERGARA-PARENTE et al. (2003b).
Diversas espécies de endoparasitas	Cultura	<i>Trichechus manatus</i>	Florida, EUA.	RIDGWAY e HARRISON (1985).
Morbilivírus	VN/EIA	<i>Trichechus manatus</i>	Belize	SULZNER et al. (2012)

*As subespécies *Trichechus manatus manatus* e *Trichechus manatus latirostris* foram consideradas apenas o gênero e espécie, para melhor visualização. Legenda: MAT: Teste de Aglutinação Modificada; SAM: Microtécnica de soroaglutinação; PCR: Reação de Cadeia da Polimerase; VN: neutralização viral; EIA: ensaio imunoenzimático.

Quadro 1: Agentes etiológicos descritos em sirênios, segundo tipo de diagnóstico e a localização geográfica.

Nas últimas décadas vêm ocorrendo inúmeras descobertas no diagnóstico e no tratamento de doenças infecciosas dos mamíferos aquáticos, não somente pelo avanço das técnicas de diagnóstico como por uma maior intervenção antrópica e a permanência destes animais em cativeiro (BOSSART et al., 2001). As doenças bacterianas têm sido causas crescentes na mortalidade, com novos casos de infecção e a resistência aos antibióticos pelos animais reintroduzidos tem levado grandes riscos às populações nativas (DUNN, BUCK e ROBECK, 2001). Evitar a soltura ao ambiente natural de animais que tenham tido contato com patógenos ou mesmo que tenham recebido uma menor carga de antibióticos podem minimizar os riscos de introdução de bactérias resistentes no ambiente natural.

No Brasil, os filhotes após o resgate são transferidos para o Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS), do CMA/ICMBio localizado na Ilha de Itamaracá, Estado de Pernambuco. Neste local passam por um período mínimo de dois anos em processo de reabilitação em recintos artificiais e com intenso acompanhamento médico veterinário. Após o desmame, aqueles que tiverem com comportamento e saúde considerados aptos para serem reintroduzidos, são translocados para cativeiro em ambiente natural, para um período de readaptação onde são expostos aos fatores que encontrarão após a soltura, como mudança de maré, correnteza e presença de outros animais. Os cativeiros de readaptação, já existentes no Brasil, foram construídos nas Áreas de Proteção Ambientais (APA) da Barra do Rio Mamanguape, na Paraíba e na Costa dos Corais, em Alagoas, respectivamente (LUNA e PASSAVANTE, 2010).

2.4 PATÓGENOS QUE PODEM ACOMETER OS PEIXES-BOIS MARINHOS

2.4.1 Agentes Virais

Os estudos sobre as viroses em mamíferos aquáticos, apesar de ainda pouco difundidos em comparação com as demais espécies, vem crescendo em todo mundo, em especial, os relacionados às morbiliviroses (RUOPPOLO, 2003; GROCH et al. 2014). O isolamento de vírus vem sendo realizado em amostras de animais necropsiados ou vivos oriundos de cativeiro ou de vida livre (BOSSART et al., 2001), sendo utilizada principalmente a técnica de Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) (PUGLIARES et al., 2007).

A enterite viral causada por coronavírus e rotavírus, devido a sua própria natureza, é

uma condição infecciosa influenciada por determinados fatores de transmissão, relacionados à manutenção dos agentes infecciosos na população animal e no meio ambiente (HOMEM, MENDES e LINHARES, 1999). A manifestação clínica e patológica da doença é influenciada pela idade, condição corporal, *status* imunitário, virulência do agente viral, carga infecciosa, via de transmissão, composição da microbiota intestinal do hospedeiro, condições debilitantes e estressantes, bem como infecções intercorrentes (MCADARAGH et al., 1982). Associações infecciosas também podem ocorrer com relativa frequência em um mesmo processo gastroentérico, agravando o quadro clínico (EVERMANN, MCKEIRMAN e EUGSTER, 1988). Nas enterites virais, a diarreia representa a principal alteração clínica, sendo resultado da perda do equilíbrio hidroeletrólítico no lúmen intestinal e levando à produção de fezes líquidas ou pastosas, com a presença ou não de sangue (TAMS, 2003). De acordo com a literatura consultada, não foram encontradas pesquisas sobre a infecção por rotavírus e coronavírus em sirênios.

2.4.1.1 *Rotavírus*

O gênero *Rotavirus* descrito pela primeira vez por Mebus et al. (1969) pertence à família *Reoviridae*. Morfologicamente são partículas icosaédricas sem envoltório lipoprotéico e com duas camadas protéicas constituindo a cápside (CANDEIAS, 1998). De acordo com as diferenças antigênicas detectadas na técnica da VP6, podem ser classificados em sete sorogrupos distintos, designados pelas letras A a G. Estes grupos podem infectar diferentes hospedeiros, sendo mais comumente encontrados grupos A, B e C tanto em humanos quanto nos animais e os grupos D, E, F e G nos achados médicos veterinários (ALFIERI et al. 2007).

A morbidade e mortalidade associadas ao rotavírus nos animais são bastante variáveis, porém atualmente, junto com o coronavírus são os vírus mais importantes na diarreia de bovinos neonatais (JEREZ et al., 2002). A transmissão pode ocorrer via fecal-oral, partículas virais no ambiente, na água e nos alimentos contaminados ocasionando problemas gastrointestinais devido ao tropismo do vírus pelo intestino delgado (FENNER et al., 1987; QUINN et al., 2005; ALFIERI et al., 2007). A transmissão do vírus dos animais para o homem ocorre com frequência, especialmente em condições de higiene insatisfatória (GREGORI, 1999; ALFIERI et al., 1999) Para se evitar a disseminação do vírus, as medidas de biossegurança a serem adotadas não podem estar restritas a tomada de medidas de caráter higiênico e sanitário e sim, incluir um manejo dos animais de forma a separá-los por idade e

presença ou não de doenças, realizar a quarentena dos animais recém chegados ou doentes, além da correta desinfecção do ambiente (QUINN et al., 2005; ALFIERI et al., 2007).

O período de incubação do rotavírus é curto e pode ocorrer co-infecção de outros agentes como *Escherichia coli* e *Cryptosporidium* spp., dificultando o diagnóstico e agravando o quadro clínico e podendo levar ao óbito (QUINN et al., 2005) Os sinais clínicos da rotavirose podem ser facilmente confundidos com uma série de outros patógenos, portanto, somente o exame laboratorial pode confirmar o diagnóstico. Na rotina clínica, a microscopia eletrônica é a mais indicada, mas em casos onde seja possível o cultivo celular ou a utilização da PCR, PAGE, ELISA os dados serão mais precisos, pois poderá ser feito o diagnóstico diferencial com outros agentes etiológicos (FENNER et al., 1987; ALFIERI et al., 2007).

Os rotavírus são ainda pouco conhecidos entre os estudos realizados com mamíferos marinhos, em especial dos sirênios, no entanto estudos com pinípedes demonstraram a presença deste agente colhidos em swabs retais, tendo se atribuído um grande potencial zoonótico (TRYLAND et al., 2013).

2.4.1.2 *Coronavirus*

O *Coronavirus* descrito inicialmente por Mebus et al. (1973) pertence a família *Coronaviridae* e são, de acordo com a reatividade sorológica e do hospedeiro, divididos em três grupos (grupo I, II e III). O grupo I tem como principais hospedeiros os suínos, gatos e cães. O grupo II geralmente é encontrado nos humanos, suínos, bovinos, aves e camundongos e o grupo III em aves, bovinos, equinos e suínos (LOVATO e DEZENGRINI, 2007). Nestas espécies causam problemas gastrointestinais, doenças respiratórias, peritonite e hepatite, no entanto muitas vezes se apresenta como subclínica (FENNER et al., 1987; LOVATO e DEZENGRINI, 2007).

No intuito de prevenção e controle deste vírus deve ser realizado o manejo sanitário do ambiente e a higiene dos manipuladores de alimentos para evitar a contaminação fecal-oral dos suscetíveis, assim como deve-se separar os indivíduos positivos e negativos para que não ocorra a contaminação direta dos animais (LOVATO e DEZENGRINI, 2007)

A técnica de microscopia eletrônica é a mais comumente utilizada para o diagnóstico do coronavírus, mas RT-PCR, quando disponível é o método que direcionará o resultado podendo mais facilmente diferenciar do rotavírus, uma vez que estes dois agentes possuem relação antigênica (LOVATO e DEZENGRINI, 2007).

Diversas espécies de animais silvestres e domésticos, em diferentes idades são suscetíveis ao coronavírus (LOVATO e DEZENGRINI, 2007). Entretanto poucos estudos foram verificados com a presença de coronavírus em mamíferos aquáticos, podendo apresentar-se de forma assintomática, e em alguns casos fatal, conforme descrito em leões-marinhos como o principal hospedeiro (KENNEDY-STOSKOPF, 2001).

2.4.2 Agentes Bacterianos

2.4.2.1 *Enterobactérias*

As enterobactérias são microrganismos geralmente móveis, aeróbicos e anaeróbicos facultativos, oxidase negativo, catalase positivo, fermentadores de glicose e redutores de nitrato a nitrito como parte dos processos de geração de energia (SCANLAN, 1991). Esses microrganismos pertencem à família das Enterobacteriaceae, que inclui uma série de espécies como *Escherichia* sp., *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Morganella* sp., *Yersinia* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp., entre outras (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004). Alguns desses gêneros fazem parte da microbiota normal do trato intestinal dos animais, tendo um papel benéfico na produção de determinadas vitaminas e aminoácidos essenciais. Outros gêneros são caracterizados pela sua patogenicidade e virulência ao hospedeiro. No entanto, todos podem provocar endotoxemias, independentemente de apresentarem ou não patogenicidade (BROOKS, BUTEL e ORNSTON, 2004).

Os testes bioquímicos podem ser utilizados para os diagnósticos das espécies de enterobactérias, no entanto a PCR pode ser utilizada como ferramenta nos métodos moleculares fornecendo maior especificidade (QUINN et al., 2005).

2.4.2.1.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa, encontrada normalmente na microbiota gastrintestinal, no entanto pode causar doenças nos animais. Quando encontradas no trato digestivo, geralmente são normais e desejáveis, mas quando encontradas no ambiente são indícios de contaminação fecal. A *E. coli* é classificada de acordo com os patótipos identificados por estudos de biologia molecular, assim como produtora de toxina tipo Shiga

(STEC), enteroinvasora (EIEC), enterotoxigênica (ETEC) e enteropatogênica (EPEC) (FERREIRA e KNOBL, 2000; QUINN et al., 2005; SAIDENBERG, 2008).

As cepas de *E. coli* capazes de produzir doenças tem como principal via de transmissão a fecal-oral e causam diferentes tipos de diarreia, dependendo da cepa que está acometendo o animal (OLIVEIRA, 2000; HIRSH e ZEE, 2003).

O diagnóstico para as diarreias causadas por *E. coli* devem ser inicialmente pelas sinais clínicos e posteriormente por comprovação laboratorial. Estas análises podem ser realizadas com amostra fecal semeadas em meio seletivo, no entanto estes resultados são inespecíficos, muitas vezes sendo difícil a diferenciação entre outros agentes. A quantificação das bactérias também pode ser um meio de diagnóstico quando se encontram no intestino delgado, porém a detecção por meio de sondas de DNA ou *primers* (iniciadores) para PCR específicos para cada base correspondente são de maior confiabilidade (HIRSH e ZEE, 2003).

Para prevenir a ocorrência de doenças causadas por estas bactérias, é necessário a desinfecção das áreas de permanência e de alimentação dos animais, adoção de medidas higiênico-sanitárias, isolamento de indivíduos acometidos com a bactérias e controle de roedores e pássaros ao entorno dos recintos (CARVALHO, 2007).

Em cetáceos e leões-marinhos encalhados na costa dos EUA foi isolada *E. coli* de material do intestino colhido durante a necropsia em carcaças frescas (DUNN, BUCK e ROBECK, 2001).

2.4.2.1.2 Salmonella spp.

A salmonelose é causada por um bactéria gram-negativa, anaeróbica facultativa e possui duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A *Salmonella enterica* possui seis subespécies e mais de 2.400 variantes sorológicas, no entanto é tratado apenas a nível específico (HIRSH e ZEE, 2003; CARVALHO, 2007). Os sorotipos podem variar quanto a patogenicidade com doenças mais severas, no entanto todas as espécies animais podem ser acometidas. O sorovar *Salmonella enteritidis* é o de maior prevalência, principalmente em humanos (ACHA e SZYFRES, 2003)

A principal via de transmissão e a porta de entrada é a oral-fecal, mas pode ocorrer também a transmissão pelo contato direto com alimentos, água ou superfícies contaminadas (CARVALHO, 2007). Quando identificado o agente no ambiente, sugere-se uma

contaminação fecal podendo causar doenças graves ou fatais em animais suscetíveis se não houver o controle (GREENE, 2004; GROVES, HARRINGTON e TABOADA, 2004).

A patogenia da salmonelose vai depender da suscetibilidade individual e da espécie e pode se manifestar como doença subclínica ou com sinais variados (CARVALHO, 2007). Clinicamente os animais podem apresentar febre, apatia, vômito e desidratação principalmente em filhotes e animais juvenis (BEER, 1998).

A mortalidade por salmonelose é descrita em diversas espécies animais, entretanto por se manifestar de forma subclínica o controle periódico dos animais com exame de rotina, em especial os animais silvestres em cativeiro é de extrema importância. Os animais portadores que não apresentam sinais clínicos podem estar eliminando o agente e quando submetidos à uma situação de estresse como a translocação, manejo ou mudanças no recinto podem levar a ativação da doença ou aumentar a excreção da bactéria. Sendo assim, como medida de controle deve ser incluída a avaliação periódica dos animais em cativeiro, mesmo daqueles sem evidencia clínica (CARVALHO, 2007).

O diagnóstico da salmonelose pode ser realizado na rotina clínica com o isolamento da bactéria em cultura de fezes recém colhidas com ou sem sinais clínicos. Naqueles que houver a suspeita da presença do agente, deve ser realizado exame seriado com intervalo de uma semana, pois a ausência da bactéria neste exame não significa que o animal não esteja infectado, apenas que no momento da colheita ele não estava eliminando. Caso a suspeita seja de uma septicemia pode ser realizada a hemocultura deste indivíduo. De forma complementar e confirmatória podem ser empregada a pesquisa de anticorpos por técnica de aglutinação, ELISA ou fixação de complemento (CARVALHO, 2007), caso exista o conjugado específico para a espécie animal e a infraestrutura laboratorial.

Para o controle da salmonelose, além da realização de exames periódicos, recomenda-se que seja realizada rigorosa desinfecção com hipoclorito de sódio e um constante programa de educação em higiene e saúde para os tratadores e técnicos que lidam com os animais silvestres (CARVALHO, 2007).

Esta bactéria foi isolada em mamíferos aquáticos da Califórnia, EUA e identificada com grande potencial zoonótico e resistência a antibióticos (BOGOMOLNI et al., 2008; STODDARD et al., 2008). Entre os pequenos cetáceos em cativeiro a salmonela apresentou elevada morbidade e mortalidade, causando severas infecções principalmente em filhotes (MOORE et al., 2008). No Brasil, durante procedimento de necropsia em indivíduo um jovem

de peixe-boi marinho cativo no CMA-ICMBio na Ilha de Itamaracá, PE, foi identificada e isolada a bactéria *Salmonella* spp. (VERGARA-PARENTE et al., 2003b) e em todo o mundo vêm sendo identificada nas diversas espécies de mamíferos aquáticos, principalmente em pinípedes e cetáceos (TRYLAND et al., 2013).

2.4.2.2 *Teste de Sensibilidade Antimicrobiana*

O uso de antibióticos é largamente utilizado na medicina tanto humana quanto veterinária desde a descoberta da penicilina no início do século passado. Após isso uma grande variedade de antibióticos foi sendo produzida e com isso também aumentou a resistência aos mesmos (SHINOHARA e NOBRE, 2004). Por outro lado, uma mesma colônia de bactéria pode ter comportamento diferente dependendo da fonte ou localização, assim como pode mudar de acordo com o tempo. O uso adequado dos antimicrobianos possibilita não somente uma maior eficácia no tratamento como evita que as bactérias se tornem ainda mais resistentes. Sendo assim, os testes de sensibilidade antimicrobiana são uma importante ferramenta na rotina da clínica veterinária (WALKER, 2010).

Os antibióticos agem de diferentes formas nas células bacterianas atuando em diferentes partes da célula da bactéria causando a morte ou inibição da mesma. Entre os antibióticos que atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana estão os β -lactâmicos em que se encontram os agentes dos grupos da penicilina e da aminopenicilina, este representado pela ampicilina e amoxicilina. Já entre os que inibem a síntese das proteínas bacterianas existem os grupos das tetraciclina, dos aminoglicosídeos tendo a gentamicina como representante, os macrolídeos onde se encontra a eritromicina e azitromicina. Na eleição do antibiótico, quando se determina a resistência do mesmo, deve-se evitar a utilização de outro de um mesmo grupo (SHINOHARA e NOBRE, 2004). Existem outros grupos e antibióticos de importância veterinária, mas com pouco uso em mamíferos aquáticos.

O teste de sensibilidade antimicrobiana mais facilmente utilizado é o de “difusão em disco”, por ser baixo custo e fácil utilização, por outro lado este teste não permite a precisão da sensibilidade, sendo necessário para isso testes automatizados. No teste de difusão, a sensibilização pode ser classificada em três categorias: sensível quando à administração do fármaco na dose e via recomendada é suficiente para inibir o crescimento bacteriano e quanto maior o alo produzido, maior a sensibilidade; resistente quando esta inibição de crescimento

da bactéria não ocorre com o antibiótico testado e intermediária quando não se pode determinar com precisão estas duas categorias (WALKER, 2010).

2.4.2.3 *Leptospira* spp.

A *Leptospira* spp. é uma espiroqueta gram negativa pertencente à família *Leptospiraceae*. Atualmente, existem 13 espécies que são patogênicas e agrupam mais de 260 sorovares, distribuídos em 23 sorogrupos (ADLER e MOCTEZUMA, 2010). Estas bactérias proliferam em ambientes aquáticos (BHARTI et al., 2003) e são distribuídas mundialmente infectando uma grande variedade de aves, répteis e mamíferos, incluindo o ser humano, assim como os mamíferos aquáticos (WALTZEK et al., 2012). Por causa de suas proporções epidêmicas e aumento da incidência em todo o continente, tem se evidenciado como problema de saúde pública global emergente (VIJAYACHARI, SUGUNAN e SHRIRAM, 2008).

As leptospiros penetram ativamente no organismo alcançando a corrente sanguínea e são excretadas pelo mamífero hospedeiro infectado contínua ou periodicamente com a urina, sendo a água contaminada a principal via de transmissão (DUNN, BUCK e ROBECK, 2001; CORRÊA, 2007). O contato direto com pacientes infectados, assim como com a água ou alimentos contaminados ou exposição da mucosa são as vias de transmissão da leptospirose, podendo causar doenças assintomáticas ou graves e até mesmo fatais (GROVES, HARRINGTON e TABOADA, 2004).

O teste de aglutinação microscópica é o exame sorológico padrão para diagnosticar a leptospirose. Em casos de suspeita de infecção ou mesmo para a avaliação evolutiva, são recomendadas duas a três repetições dos exames com intervalo entre duas a quatro semanas. Complementarmente pode ser usada a urina para cultura e PCR (GREENE, 2004)

O controle da liberação da leptospira em animais silvestres livres é muito difícil, portanto a prevenção deve ser realizada com a vacinação de animais domésticos e desinfecção do ambiente e alimentos, evitando-se ainda o contato com águas contaminadas (GREENE, 2004). Para animais em cativeiro ou mesmo para a população humana a prevenção deve ser realizada primeiramente identificando e eliminando as fontes de infecção do agente (FAINE, 1982).

Apesar de já relatada em outras espécies, os pinípedes são os mamíferos aquáticos mais afetados com *Leptospira* spp. existindo registro desde 1970 e já foi detectada também a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. sorovar Pomona. Nesta ocasião, centenas de

leões-marinhos (*Otaria flavescens*) vieram a encalhar e em seguida morreram. Durante a necropsia foi sugerido uma epizootia por leptospirose, baseado nos achados macroscópicos da necropsia (DUNN, BUCK e ROBECK, 2001; VEDROS et al., 2001). Stamper, Gulland e Spraker (1998) após verificar os sinais clínicos como anorexia, depressão e desidratação em foca-comum (*Phoca vitulina richardsii*) em cativeiro realizaram o exame sorológico para leptospirose e encontraram os sorovares Pomona, Grippotyphosa, Bratislava, Canicola, Icterohemorrhagiae e Hardjo.

O exame sorológico para pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. é uma procedimento seguro quando utilizado para estudos de prevalência, sendo assim indicados em investigações epidemiológicas (BEER, 1998). No Brasil, dentre os 74 peixes-bois amazônicos examinados pela microtécnica de soroaglutinação para leptospirose (SAM) no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Manaus, AM e no Centro de Pesquisa e Preservação de Mamíferos aquáticos - CPPMA, Presidente Figueiredo, Balbina, AM, 29 animais (31,1%) apresentaram anticorpos anti-*Leptospira* spp., sendo encontrados 51,3% (20/39) animais sororeagentes no INPA e 8,6% (3/35) no CPPMA. Os sorovares encontrados nos dois locais foram Patoc, Castellonis, Icterohaemorrhagiae e Butembo (MATHEWS et al., 2012).

2.4.2.4 *Brucella* spp.

A *Brucella* spp. pertence a família *Brucellaceae* e é uma bactéria intracelular facultativa, gram-negativa, aeróbica, cocobacilares e imóveis (QUINN, et al. 2005). As espécies de bactéria são diferenciadas pela característica colonial, incluindo as características fenotípicas, preferência pelo hospedeiro e patogenicidade, possuindo potencial zoonótico. Atualmente, as espécies com seus respectivos hospedeiros são: *Brucella abortus* (bovinos, caprinos, suínos, equinos e humanos), *B. melitensis* (bovinos, caprinos e humanos), *B. suis* (suínos e humanos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (caninos e humanos), *B. neotomae* (roedores), *B. ceti* (mamíferos aquáticos) e *B. pinnipedialis* (mamíferos aquáticos) (QUINN, et al. 2005; FOSTER et al., 2007, HERMANEZ-MORA, PALACIOS-ALFARO e GONZÁLEZ-BARRIENTOS, 2013). Recentemente duas novas espécies foram descritas: *B. microti* (SCHOLZ et al., 2008) e *B. inopinata* (SCHOLZ et al., 2010), sendo a primeira isolada em próteses em humanos e a segunda em camundongo do campo (*Microtus arvalis*).

A brucelose é uma importante zoonose com uma gravidade moderada, porém de grande risco para profissionais que trabalham com o manejo animal, pois eles podem se infectar pelo contato direto com os animais, com materiais biológicos e fômites (GROVES, HARRINGTON e TABOADA, 2004). As fêmeas gestantes podem apresentar aborto de natimortos no final da gestação sem qualquer apresentação anterior de sinal clínico, deixando os filhotes geralmente autolisados. Estes restos abortivos são extremamente contagiosos tanto aos demais animais quanto ao homem (GREENE, 2004).

O tratamento pode ser realizado com antibioticoterapia, geralmente gentamicina ou Trimetoprim-sulfonamida, mas as recidivas são comuns. O teste sorológico de aglutinação é geralmente o mais utilizado para o diagnóstico da *Brucella* spp., no entanto é comum o aparecimento de falsos negativos (GREENE, 2004). O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA para o controle da brucelose em bovinos e bubalinos determina os seguintes testes de diagnóstico indireto aprovados, segundo seus critérios de utilização e interpretação (BRASIL, 2013):

- (1) Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT): muito sensível e de fácil execução. Constitui o único teste de triagem e deve ser realizado por médicos veterinários habilitados;
- (2) 2-Mercaptoetanol (2-ME): teste confirmatório e que podem ser submetidos os animais que reagirem ao AAT. É mais específico e deve ser executado em laboratórios credenciados ou em laboratórios oficiais credenciados;
- (3) Teste de Fixação de Complemento (FC), ou outro que o substitua. É realizado em laboratórios oficiais credenciados para efeitos de trânsito internacional e para diagnóstico de casos inconclusivos ao teste do 2-ME;
- (4) Teste da Polarização Fluorescente (TPF). Pode ser utilizado como teste confirmatório para animais que reagirem ao AAT ou que forem inconclusivos ao 2-ME ou ser utilizado como teste único. Deve ser realizado em laboratórios credenciados ou em laboratórios oficiais credenciados

Contudo, não existem pesquisas que identificaram o melhor teste sorológico para brucelose em mamíferos aquáticos no Brasil, sendo utilizados por pesquisadores estes testes sorológicos recomendados pelo MAPA.

O primeiro relato de *Brucella* infectando mamíferos marinhos ocorreu em 1994 em populações de pinípedes e cetáceos (EWALT et al., 1994; ROSS et al., 1994.). As duas espécies de *Brucella* tipicamente marinhas podem infectar uma ampla variedade de mamíferos aquáticos (NYMO et al., 2011) e vêm sendo isolada em todo o mundo, porém raramente apresentando sinais clínicos (TRYLAND et al., 1999; NIELSEN et al., 2001; GERACI e LOUNSBURY, 2005). Recentemente, foi verificado o óbito de um golfinho na Itália em decorrência provável por um meningoencefalite ocasionada pela infecção de *B. cetti* levando a uma co-infecção de *Toxoplasma gondii* (ALBA et al., 2013).

Nos aquários da Alemanha foi descrita a ocorrência de *Brucella* spp. principalmente em focas (*Phoca vitulina*), sendo estes achados relacionados com aspectos zoonóticos por intermédio de investigações moleculares fenotípicas (PRENGER-BERNINGHOFF et al., 2008). Apesar da ocorrência da *Brucella* spp. que acometem os indivíduos terrestres atingirem os mamíferos aquáticos, foram isoladas duas novas espécies para este grupo de animais: *B. pinnipedialis* em pinípedes e *B. ceti*, em cetáceos (MAQUART, 2008). Segundo Hermanez-Mora, Palacios-Alfaro e González-Barrientos, 2013 não foram encontrados registros de *Brucella* spp. em sirênios.

2.4.3 Agente Parasitário

2.4.3.1 *Toxoplasma gondii*

O único representante da família Toxoplasmatidae, o *Toxoplasma gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1909) possui grande importância na medicina humana e veterinária, pois está mundialmente difundido em diversas espécies. O parasito é um protozoário coccídeo intracelular obrigatório e com pouca especificidade que tem o gato como hospedeiro definitivo e as demais espécies de animais endotérmicos como hospedeiros intermediários (LAPPIN, 1993; DUBEY, GREENE e LAPPIN, 1998 HILL e DUBEY, 2002; DUBEY, 2010). Os felídeos domésticos e silvestres eliminam oocistos pelas fezes ao meio ambiente e eles tornam-se esporulados e infectantes cerca de 24 a 48 h após a eliminação com a presença de temperatura, umidade e oxigênio (DUBEY, 2010).

As principais formas de transmissão do *T. gondii* são: ingestão de alimentos ou água contaminados com os oocistos, ingestão de carne crua ou mal passada de mamíferos e aves contendo bradizoítos em cistos teciduais e por taquizoítos pela via transplacentária. No entanto, estas formas de transmissão podem variar de acordo com fatores higiênico-sanitários e protocolos de manejo (DUBEY, 2010) e torna-se difícil identificar qual delas infectou os animais suscetíveis (DUBEY et al., 2012).

Entre as ações a serem tomadas preventivamente para evitar a infecção pela via fecal-oral, estão medidas como a higiene de verduras e legumes com hipoclorito, isolamento de felinos da área de permanência dos animais e desinfecção do local (mesmo salientando que os oocistos são resistentes a maioria dos desinfetantes comerciais). Nos locais onde existe a presença de gatos, a rotina de tentativa de isolamento de oocistos nas fezes pode ser também uma medida profilática e de controle do parasito no ambiente, mas de difícil obtenção (DUBEY, 2010).

Desta forma, para a realização de estudos epidemiológicos de toxoplasmose em instituições que mantêm animais silvestres cativos os testes sorológicos são mais indicados. Pelo fato de não existir um conjugado específico para cada espécie de mamífero silvestre, o teste sorológico da toxoplasmose mais utilizados nestes animais é o Teste de Aglutinação Modificada – MAT utilizando taquizoítos inativados pela formalina e 2-mercaptoetanol (DUBEY e DESMONTS, 1987). Anticorpos anti-*T. gondii* (MAT \geq 25) em mamíferos aquáticos já foram descritos em cetáceos, pinípedes e sirênios (DUBEY et al., 2003; DUBEY, 2010; JENSEN et al., 2010; MATHEWS et al., 2012; DELGADO et al., 2013).

Nos mamíferos marinhos as causas da infecção por *T. gondii* ainda não estão definidas. Os sinais clínicos nestes animais são encefalites, miocardite e abortamento, podendo ocorrer o óbito (DUBEY, 2010). A presença do parasito tem sido descrita em pinípedes, cetáceos e sirênios causando encefalite, no entanto casos subclínicos são comuns. Os principais diagnósticos nestes animais são: exames sorológicos e de imunohistoquímica que é realizada em materiais biológicos colhidos de animais necropsiados, onde o parasito pode ser encontrado nos tecidos do fígado, pulmão e coração (DUBEY et al., 2003; DAILEY, 2001; BUERGEL e BONDE, 1983). Resendes et al. (2004) examinou pinípedes que vieram à óbito na Espanha e também verificou a presença de *T. gondii* nos tecidos destes animais. Dubey (2009) verificou que golfinhos e morsas cativos nos EUA foram soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii*. No Brasil, anticorpos anti-*T. gondii* foram descritos em 86,3%

(82/95) botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*) (SANTOS et al., 2011) e Gonzales-Viera et al. (2013) identificaram o agente pela imunistoquímica uma fêmea de boto-cinza (*Sotalia guianensis*) no Paraná.

Em sirênios, anticorpos anti- *T. gondii* foram identificados em peixes-bois marinhos em reabilitação dos EUA, sendo atribuída esta infecção pelo contato dos alimentos destes animais com fezes de felinos domésticos e selvagens (MEASURES et al., 2003). Na América latina foram realizados exames sorológicos para toxoplasmose somente em peixes-bois amazônicos no Brasil (MATHEWS et al., 2012) e no Peru (DELGADO et al., 2013).

2.5 ANÁLISE DE SOBREVIDA DE PEIXE-BOI MARINHO EM CATIVEIRO

Na medicina veterinária os estudos de sobrevida são geralmente realizados para espécies ameaçadas com o objetivo de verificar os possíveis padrões e causas de mortalidade. Nestes estudos, uma tabela de vida pode ser construída como um registro da sobrevivência e taxas de reprodução em uma população, que pode ser dividida por idade, tamanho ou estágio de desenvolvimento (DONAVAN e WELDON, 2002) Estas informações poderão auxiliar nos esforços de medidas conservacionistas norteando as tomadas de decisões com a formação de políticas públicas e estratégias de manejo direcionadas aos problemas populacionais (CROUSE, CROWDER e CASWELL, 1987). Entretanto, os estudos de sobrevida utilizando modelos de tabela de vida são raros, mas conforme mencionado pode constituir de uma importante ferramenta na discussão sobre a viabilidade a longo prazo da espécie em perigo de extinção (STOLEN e BARLOW, 2003)

Em estudos populacionais com peixe-boi marinho da Florida, Marmontel, Humphrey e Shea (1997) verificaram que a espécie poderia acelerar ou reduzir o tempo de extinção, baseados na mortalidade de adultos, propondo que uma redução de 10% na taxa de mortalidade poderia atrasar em até 100 anos a extinção da espécie. Estes dados forneceram subsídios para que medidas de políticas públicas fossem adotadas nos EUA tais como um maior rigor no controle do trafego de embarcações, possibilitando uma redução de mortalidade. No Brasil, não existem estudos de sobrevida em peixes-bois marinhos mantidos em vida livre e em cativeiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

Os peixes-boi marinhos foram provenientes de três diferentes cativeiros: recintos de reabilitação no CMA/ICMBio, Ilha de Itamaracá, Pernambuco (7°48'33.40"S, 34°50'16.36"O) (Figura 3); recintos de adaptação na Barra de Mamanguape, Paraíba (6°46'43.68"S, 34°55'50.88"O) (Figura 4) e em Porto de Pedras, Alagoas (9°13'05.47"S, 35°19'59.01"O) (Figura 5).

O CMA/ICMBio possui na Ilha de Itamaracá/PE o Centro de Reabilitação de Mamíferos Aquáticos (CRAS/CMA/ICMBio), onde, após a chegada ou nascimento, os peixes-bois marinhos recebem acompanhamento clínico médico veterinário especializado até o momento da translocação para os cativeiros da Barra de Mamanguape/PB ou Porto de Pedras/AL. Em Pernambuco, os animais, geralmente, permanecem em média de três a quatro anos quando são levados para um dos recintos de adaptação na Paraíba e em Alagoas, onde passam por um período que varia de três a 12 meses de acordo com cada indivíduo.

Na Ilha de Itamaracá os animais ficam subdivididos em duas áreas. Uma é aberta à visitação pública onde permanecem os indivíduos com baixa ou nenhuma probabilidade de soltura e a outra a visitação é restrita, onde estão os indivíduos em processo de reabilitação para serem reintroduzidos. O local possui 16 recintos, sendo três grandes "oceanários" que ficam abertos ao público. A área fechada à visitação possui quatro recintos intermediários para a permanência de animais juvenis em pré-adaptação para a soltura e nove piscinas adaptadas para a permanência de indivíduos menores e recém-chegados que necessitem passar por um período de quarentena (LUNA e PASSANTE, 2010). O CRAS conta ainda com laboratório de análises clínicas para realizar os exames de bioquímica sérica, hemograma e parasitológico de fezes; um laboratório de análise da qualidade água para verificação dos parâmetros físicos e uma sala de preparo de alimentos para os animais.

A desinfecção do ambiente do CRAS foi realizada de acordo com o tamanho e presença ou não de animais. Nos recintos em que era possível fazer a retirada dos animais durante um período, a água recebia tratamento químico com hipoclorito de sódio líquido, de forma a manter a concentração de cloro ativo em 0,2% e posteriormente esta água era distribuída para os demais recintos.



Figura 3: Recintos de manutenção de peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) no CRAS/CMA/ICMBio na Ilha de Itamaracá/PE (CRAS/PE). Fonte: Acervo CMA/ICMBio.

O cativeiro de adaptação em ambiente natural na Paraíba foi a primeira base do projeto peixe-boi marinho e situa-se dentro da Área de Proteção Ambiental (APA) da Barra de Mamanguape/PB. Esta foi criada por meio de Decreto Presidencial nº 924, de 10 de setembro de 1993 tendo entre os objetivos garantir a conservação do hábitat do peixe-boi marinho e proteger, dentro da área da Unidade de Conservação, esta espécie das ameaças de extinção (LUNA et al., 2011). Este cativeiro em 2011 deixou de estar sob responsabilidade do CMA/ICMBio e passou a ser mantido pela própria APA. Em 2012 com o óbito de três indivíduos e a soltura do último exemplar cativo no local, o cativeiro foi desativado não sendo mais translocados novos indivíduos. Durante os anos em que esteve ativo, foram reintroduzidos 12 peixes-bois marinhos ao ambiente natural.

O segundo cativeiro de adaptação, construído em 2008, localiza-se no estuário do rio Tatuamunha, Porto de Pedras/AL e está inserido na APA Costa dos Corais (Figura 6). Esta Unidade de Conservação foi criada em 23 de outubro de 1997 por meio do Decreto nº 23, sendo a maior Unidade de Conservação marinha federal. Atualmente, este é o principal cativeiro de adaptação para soltura de peixe-boi marinho no Brasil. Anteriormente a esta data, os animais que foram soltos neste estado, permaneciam em semi-cativeiros provisórios no do

mar e posterior à soltura estes recintos eram desativados. Ao todo, levando em consideração apenas o Estado de Alagoas, independentemente do tipo de cativeiro, foram reintroduzidos desde 2004, 26 peixes-bois marinhos.



Figura 4: Cativeiro de adaptação de peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) em ambiente natural, rio Mamanguape, Barra de Mamanguape/PB. Foto: Acervo CMA/ICMBio.



Figura 5: Cativeiro de adaptação de peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) em ambiente natural, rio Tatuamunha, Porto de Pedras/AL. Foto Acervo CMA/ICMBio.

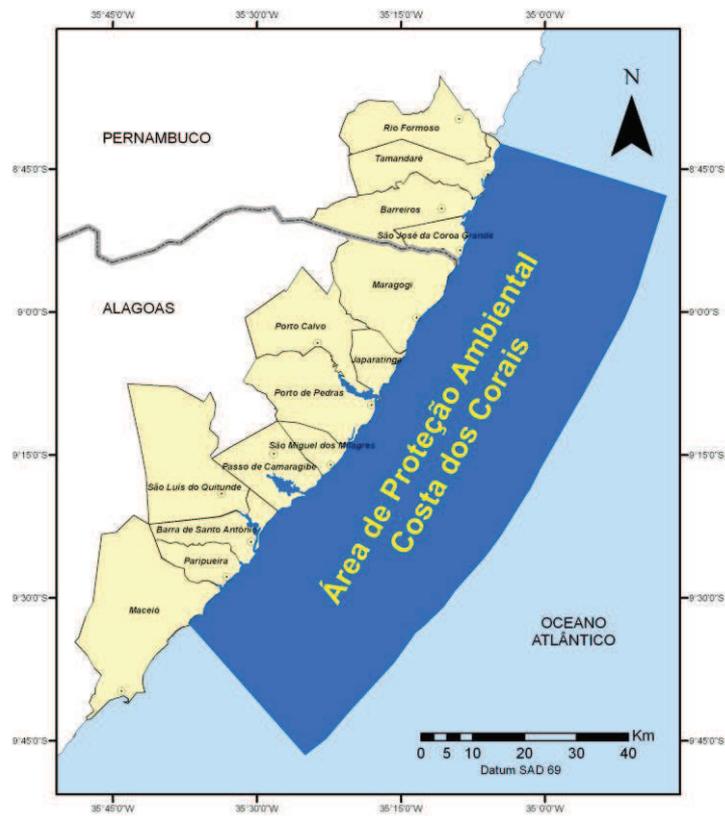


Figura 6: Mapa de limites da APA Costa dos Corais.

Fonte: APA Costa dos Corais.

3.2 ANIMAIS

Os peixes-boi marinhos foram diferenciados de acordo com o sexo, faixa etária e origem. Com relação à faixa etária, os animais foram divididos em neonatos, filhotes, juvenis e adultos (Quadro 2). Entretanto para as análises das prevalências, as categorias neonatos e filhotes foram ambas consideradas como filhotes.

Faixa etária	Idade (dias)	Idade (meses)
Neonato	0 a 30	0 a 1
Filhote	31 a 730	1 a 2
Juvenil	731 a 2190	2 a 6
Adulto	Acima de 2191	Acima de 6

Quadro 2: Determinação da faixa etária de peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) dividido em dias e meses.

O termo “origem” foi adotado para o local de nascimento dos animais se em cativeiro ou em ambiente natural e o termo “condição”, para o local de permanência do animal no momento da colheita das amostras biológicas (Quadro 3).

Condição do animal	Descrição da condição
Animal em reabilitação	Animais resgatados sejam de encalhes ou cativeiro inadequado e animais nascidos em cativeiro que estavam em recintos em condições artificiais com o objetivo de receberem cuidados clínicos de forma temporária ou permanente.
Animal em adaptação	Animais que passaram pelo cativeiro de reabilitação e após condição de saúde adequada para a soltura, passaram por um período em cativeiro em ambiente natural para aprendizagem e contato com as condições ambientais que encontrará após a reintrodução.
Animal reintroduzido	Animais que após passarem por um período de reabilitação e com o atestado de exames clínicos aprovados por médicos veterinários foram soltos com ou sem monitoramento.

Quadro 3: Descrição das condições dos peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) de acordo com a localização em cativeiro.

Para cada peixe-boi marinho que houve colheita de amostra, foi determinado um número de identificação individual (ID) para a pesquisa, que foi mantido até o término das análises.

3.3 CONTENÇÃO E COLHEITA DE AMOSTRAS

Os animais foram contidos em maca confeccionada para o manejo da espécie e mantidos em colchões encharcados com água, sendo umedecidos constantemente para evitar o ressecamento da pele. A atividade foi realizada no menor tempo possível, para evitar estresse ao animal (Figura 7).



Figura 7: Contenção de peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) para a colheita de material biológico. Notar o corpo do animal sendo hidratado durante a atividade para minimização do estresse.

Para salvaguardar o bem-estar do animal durante todo o procedimento foi avaliado o grau de estresse de acordo com planilha elaborada pelo Dr. Robert K. Bonde (comunicação pessoal), com adaptações. Para decidir sobre manter ou interromper a atividade, o animal foi analisado e pontuado em relação ao reflexo, atividade, frequência cardíaca, temperatura e a frequência respiratória. Quanto ao reflexo foi considerado a reação do animal quanto ao toque no corpo durante o manejo, reflexo palpebral e toque na nadadeira peitoral. A pontuação variou com números inteiros de zero a dois (0-2), sendo zero (0) quando inexistente, um (1) com existente, mas fora do ideal e dois (2) existente e dentro dos padrões de normalidade. Esta avaliação ocorria a cada 10 minutos, podendo ocorrer em tempo menor, caso fosse verificado que o animal apresentou mudança significativa em um dos parâmetros durante o intervalo das verificações. Caso verificado que a soma do resultado estivesse acima de 8, a atividade era mantida sem restrições; com valores entre cinco e sete, o animal era molhado e observado com mais intensidade, no entanto interrompida a colheita de amostras de sangue e swab; valores entre um e quatro a atividade era imediatamente interrompida e o animal retornava ao ambiente em que foi retirado e se a soma fosse zero, era feita a verificação de sinais vitais para verificar se o animal tinha vindo à óbito (Quadro 4).

Parâmetros	Resultado	Valores base
Reflexo	()0 ()1 ()2	0= ausente; 1=pouco reflexo; 2= Reflexo normal
Atividade	()0 ()1 ()2	0=ausente; 1=pouca atividade; 2= atividade normal
Frequência cardíaca	()0 ()1 ()2	0=ausente; 1= ≤ 50 ou ≥ 90 ; 2 = entre 51 e 90
Temperatura	()0 ()1 ()2	0 $\leq 25^{\circ}\text{C}$; 1=entre $20-25^{\circ}\text{C}$ ou $>38^{\circ}\text{C}$; 2=entre $26-27^{\circ}\text{C}$
Frequência respiratória	()0 ()1 ()2	0=ausente; 2= entre 1-2/ 3 min; 1 = outros valores
Total: (0-10)	(<input type="text"/>)	8-10 – Muito bom – manter a atividade; 5-7 – Regular – Atenção no animal; 1-4 – Crítico – reintroduzir o animal imediatamente; 0 – Óbito.

Quadro 4: Valores de avaliação de estresse dos peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) manejados, com pontuações baseadas nos sinais vitais.

As colheitas dos materiais biológicos foram realizadas em conjunto com médicos veterinários indicados pelo CMA/ICMBio (Augusto Carlos da Boaviagem Freire e Glaucia Pereira Sousa) e de acordo com o protocolo de manejo estabelecido pela instituição, sendo assim a frequência de colheita variou de acordo com a frequência dos manejos. Desta forma, cada indivíduo foi manejado com ordem de colheita de forma aleatória e por conveniência (PEREIRA, 1995). Para cada colheita foram utilizadas luvas de procedimentos diferentes em cada amostra, ou seja, após a colheita de sangue a luva era trocada para a colheita do swab e novamente para a colheita das fezes a fim de evitar contaminação entre as amostras.

A autorização de captura e manejo dos peixes-boi marinhos cativos foi concedida pelo órgão competente por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO do ICMBio sob número sob o número 20685 (Anexo 1).

As amostras sorológicas foram obtidas conforme descrito por Bossart et al. (2001b), com colheita de sangue no plexo braquial entre o rádio e a ulna (Figura 8) com tubo de colheita à vácuo sem anticoagulante (Figura 9). Os animais que se encontravam vivos e em cativeiro durante a pesquisa, foram colhidas amostras sorológicas durante o período de abril de 2010 a maio de 2013. Para os animais já reintroduzidos ou que tinham vindo a óbito, que houvesse amostra sorológica em estoque, foram utilizadas as amostras armazenadas no CMA/ICMBio desde 2003. Em todos os casos, independente do período, após as colheitas, o material foi centrifugado, separado o soro sanguíneo em microtubos de polipropileno com capacidade de 1,5 mL e em seguida congelado em freezer -20°C até o momento da análise laboratorial.

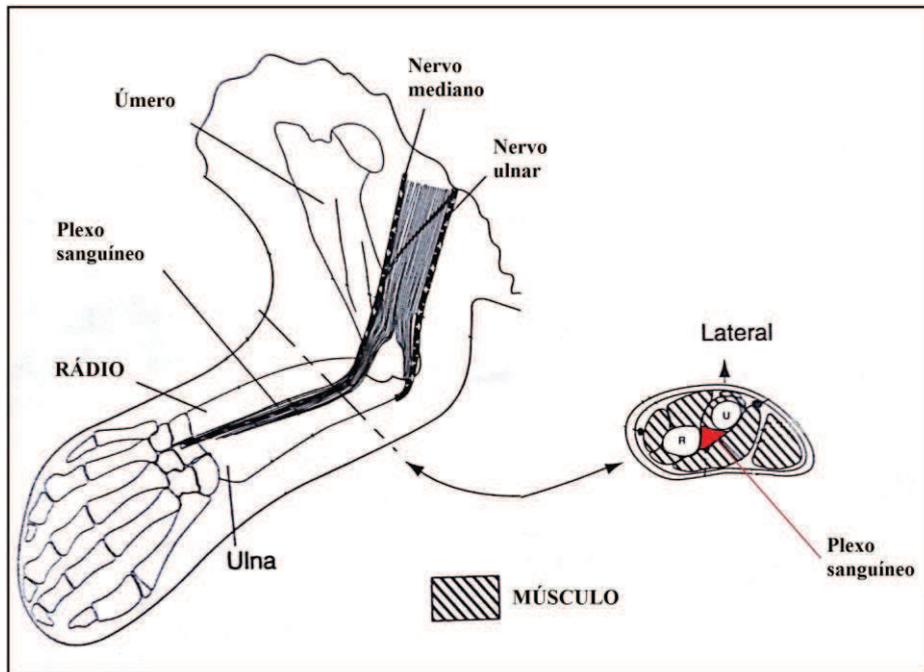


Figura 8: Esquemática da veia para colheita de sangue em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*). Adaptado de Bossart et al. (2001a).



Figura 9: Colheita de sangue da nadadeira peitoral (plexo braquial entre o rádio e a ulna) de peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) utilizando tubo de colheita à vácuo. Fonte: Acervo CMA/ICMBio.

Os materiais para isolamento das enterobactérias foram colhidos com swab estéril de haste flexível e ponta de algodão, inseridos cuidadosamente na narina, boca, reto e genitália dos animais, realizado um movimento circulatório, retirado o swab e inserido em frasco também estéril contendo meio de transporte Stuart e mantidos a 4°C até a realização dos exames. Quando o animal apresentava ferimentos ou abscessos o mesmo procedimento foi realizado nestes locais (Figura 10).

As fezes foram colhidas diretamente da ampola fecal, com luva de procedimento descartável e foram armazenadas em potes estéreis no congelador com temperatura a -20°C até a análise laboratorial.

Foi elaborado um protocolo de colheita das amostras de acordo com os exames que foram realizados (Apêndice A).



Figura 10: Colheita de amostra para isolamento de enterobactérias em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) com swab estéril. A) Swab estéril com meio de transporte Stuart; B) Narina; C) Oral; D) Genital; E) Anal; F) Abscesso. Fonte: Acervo CMA/ICMBio.

3.4 PROCESSAMENTO LABORATORIAL

3.4.1 Pesquisa de Agentes Virais

O processamento laboratorial para pesquisa de agentes virais foi realizado no Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular Aplicadas no Departamento de Medicina

Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP sob a supervisão do Professor Doutor Fábio Gregori.

As amostras fecais foram colhidas da ampola retal após assepsia com água e desprezando a primeira porção das fezes. O material foi estocado a -20°C em tubo estéril até a chegada ao laboratório (Figura 11).



Figura 11: Colheita de fezes da ampola retal de peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) para análise de agentes virais. Fonte: Acervo CMA/ICMBio.

Para a triagem as amostras foram preparadas a 50% (p/v) em água previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) e posteriormente clarificadas por centrifugação a 2.000 G por 15 minutos a 4°C . Os sobrenadantes foram aliqüotados em novos tubos e armazenados a -20°C para posterior extração.

A extração do DNA foi realizada adicionando para cada $250\mu\text{L}$ de suspensão fecal $750\mu\text{L}$ de Trizol[®] e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período foram adicionados $200\mu\text{L}$ de clorofórmio (Merck[®]), homogeneizados e novamente incubadas a temperatura de 4°C por 5 minutos. A mistura foi então centrifugada a 12.000 G a 4°C por 15 min. Após esta etapa, transferiu-se $400\mu\text{L}$ do sobrenadante (fase aquosa) a novos tubos

contendo 500 μ L de isopropanol (Merck[®]). Estes tubos foram agitados por inversão e incubados por 15 minutos a temperatura de -20°C. Transcorrido esse tempo os tubos foram centrifugados a 12.000 G a 4°C por 15 min. Foi aspirado o sobrenadante, sendo o “pellet” obtido, lavado com 950 μ L de etanol 75% (Merck[®]) e centrifugado a 12.000 G durante 10 min. Após, o mesmo foi seco em banho-maria seco a 56° C e ressolubilizado em 15 μ L de água previamente tratada com DEPC e incubado a 56°C por 10 minutos. O RNA foi estocado a -70°C até a etapa de amplificação.

A Reação Transversa (RT) foi realizada num volume total de 20 μ L, contendo 4 μ L de Buffer 5x, 2 μ L de dNTP 10 mM, 2 μ L de DTT (50 μ M), 1 μ L de SuperScript[™] III Reverse Transcriptase RT (200 U/ μ L) - Invitrogen[®], 1 μ L de Random primers (50 nM), 3 μ L de água ultra-pura e 7 μ L de RNA previamente desnaturado.

Com o objetivo de realizar a desnaturação do RNA, as amostras de foram submetidas a 95°C/ 5 minutos, sendo imediatamente mantidas em banho de gelo. A RT foi realizada a temperatura de 37° C por uma hora e a 70° C por 15 minutos com hold a 4° C em termociclador.

3.4.1.1 Rotavírus

A reação de PCR para diagnóstico de rotavírus do grupo A foi realizada num volume total de 25 μ L, contendo 1X PCR Buffer, 0,5 μ M de cada primer (VP6F e VP6AS), 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polymerase, 1,5 mM de MgCl₂, 5 μ L de RNA (amostra) e água ultra-pura q.s.p. 25 μ L. Os tubos foram submetidos a 40 ciclos de 95°C por 3 minutos, 95°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 1 minuto, 72°C por 10 minuto e hold de 10°C.

Os produtos provenientes da reação de PCR foram visualizados pela eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5X, corados com brometo etídeo a 5% e visualizados sob luz UV. O produto esperado foi de 598 pares de base (pb), de acordo com a adição de 100 Bp DNA Ladder (Invitrogen). A todos os ensaios foi acrescida a amostra padrão NCDV de rotavírus do grupo A e água ultra pura, respectivamente, como controles positivo e negativo (Quadro 5).

Primer VP6	Sequência (5'→3')	Amplicon (pb)	
VP6F* (senso)	GGCTTTTAAACGAAGTCTTC	1-20	
VP6AS579-598 (antissenso)	CCAGCTACYTGAATTTCTGA	598 ^a	579-598

Quadro 5: Descrição do primer VP6 utilizado para a detecção do rotavírus.

Os amplicons provenientes das reações de PCR que resultaram positivas foram sequenciados para confirmação dos resultados.

Inicialmente eles foram tratados com EXOSAP-IT[®] seguindo as recomendações do fabricante.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o BigDye XTerminator[®] Purification Kit v. 3.1 (Life Technologies[®]) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Para a remoção de terminadores não incorporados, as amostras fecais foram tratadas com Big Dye Xterminator[™] (Life Technologies[®]) e as sequências nucleotídicas definidas em Sequenciador 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.4.1.2 Coronavírus

Foi inicialmente realizada uma reação visando o diagnóstico genérico de coronavírus e em seguida uma reação tipo "nested" visando detecção de Beta-coronavírus.

A primeira amplificação foi realizada num volume total de 25 µL, contendo 1X PCR Buffer, 0,5 µM de cada primer (4Bm e 2Bp), 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polymerase, 1,5 mM de MgCl₂, 5 µL de RNA (amostra) e água ultra-pura q.s.p. 25 µL. Os tubos foram submetidos a 6 ciclos de 94°C por 2 minutos, 94°C por 1 minuto, 40°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto, em seguida 36 ciclos de 94°C por 1 minuto 50°C por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 1 minuto, 72°C por 10 minutos e hold de 10°C.

Os produtos provenientes da reação de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5X, corados com brometo etídeo a 5% e visualizados sob luz UV. O produto esperado é de 251 pares de base (pb), de acordo com a adição de 100 Bp DNA Ladder (Invitrogen).

Em todos os ensaios foi acrescentada a amostra padrão BcoV de coronavírus e água ultra pura, respectivamente, como controles positivo e negativo (Quadro 6).

Primer	Sequência (5'→3')	Amplicon (pb)
2Bp (senso)	ACTCA(A/G)(A/T)T(A/G)AAT(T/C)TNAATA(T/C)GC	251
4Bm (antisenso)	TCACA(C/T)TT(A/T)GGATA(G/A)TCCCA	

Quadro 6: Descrição do primer utilizado para a detecção do coronavírus.

A reação "nested"-PCR realizada num volume total de 25 µL, contendo 1X PCR Buffer, 0,5 µM de cada primer (CV2U e CV2L, 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polymerase, 1,5 mM de MgCl₂, 5 µL de do produto proveniente da primeira amplificação por PCR e água ultra-pura q.s.p. 25 µL (BRANDÃO et al., 2005). Para a amplificação, os tubos foram submetidos a 40 ciclos de 94°C por 2 minutos, 94°C por 1 minuto, 54.8°C por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 1 minuto, 72°C por 10 minuto e hold de 10°C.

Os produtos provenientes da reação de PCR foram visualizados pela eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5X, corados com brometo etídeo a 5% e visualizados sob luz UV.

O produto esperado é de 136 pares de base (pb), de acordo com a adição de 100 Bp DNA Ladder (Invitrogen). A todos os ensaios foi acrescida a amostra padrão BcoV de coronavírus e água ultra pura, respectivamente, como controles positivo e negativo (Quadro 7).

	Primer	Sequência (5'→3')	Amplicon (pb)
Corona	CV2L (senso)	AACATCTTTAATAAGGCGRCGTA	136
	CV2U(antisenso)	TACTATGACTGGCAGAATGTTTCA	

Quadro 7: Descrição do primer CV2 utilizado para a detecção do coronavírus.

3.4.2 Pesquisa de Agentes Bacterianos

3.4.2.1 Enterobactérias

Os swabs em meio de transporte Stuart foram levados para o Laboratório de Doenças Infeciosas do Departamento de Medicina Veterinária – DMV/UFRPE, Recife/PE com a coordenação do Professor Doutor Rinaldo Aparecido Mota.

Uma alíquota das amostras de swabs foi incubada em caldo BHI (*Brain Herat Infusion*) em estufa bacteriológica a uma temperatura de 37°C por 24 h e posteriormente realizado o subcultivo em ágar MacConkey novamente a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram avaliadas as características morfológicas das colônias isoladas e procedeu-se a técnica de Gram. A diferenciação das bactérias Enterobacteriaceae foi realizada por testes bioquímicos relacionados à atividade catabólica da bactéria e demonstrando um substrato específico.

As colônias foram analisadas individualmente quanto aos aspectos morfológicos e bioquímicos. Quanto aos aspectos morfológicos foram considerados a cor, aspecto, tamanho, crescimento, forma e hemólise. Quanto aos testes bioquímicos verificou-se se a colônia reagiu positivamente ou negativamente ao citrato, lisina, vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), meio *triple sugar iron* (TSI), urease, motilidade, indol e H₂S (Tabela 1).

3.4.2.1.1 *Escherichia coli*

Durante o período novembro de 2011 a abril de 2013, as amostras identificadas como *Escherichia coli* foram armazenadas em meio BHI glicerinado e encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana no Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas/SP. As análises foram realizadas com a coordenação do Professor Doutor Wanderley Dias da Silveira e do pós doutorando Renato Paris Maluta.

Das amostras anteriores não foram diferenciadas as cepas de *E. coli*, pois somente com os resultados dos isolamentos de enterobactérias e a constatação de que estas poderiam ser comuns ao ambiente, se optou por tentar isolar cepas patogênicas.

As amostras foram semeadas em meio de cultura com ágar base e realizada a confirmação da especificação. As amostras confirmadas como *E. coli* foram então

processadas pela reação em cadeia da polimerase - PCR, sendo utilizadas somente as cepas causadoras de doenças gastrintestinais. Nas placas de gel foram utilizados os primers dos grupos enteropatogênicos (EPEC), enterotoxigênico (ETEC), produtores de Shiga-toxina (STEC), ExPEC e grupos filogenéticos.

Tabela 1: Demonstração da diferenciação bioquímica de enterobactérias, com destaque dos parâmetros utilizados nas análises realizadas, exemplificando cinco das enterobactérias utilizadas (Adaptação de BUCHANAN, GIBBON E BERGEY, 1975)

Testes\espécies	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
Glicose Gás	+	+	+	+	+
Lactose	+	D	+	+	-
Sacarose	D	-	+	+	+
Citrato	-	+	+	+	+/-
Vermelho De Metila	+	+	-	-	+
Voges-Proskauer	-	-	+	+	d
Produção H ₂ S	-	+	-	-	+
Indol	+	-	d	-	+
Lisina	+	+	-	+	d
Urease	-	-	-	(d)	+
Motilidade	+/-	+	-	+	+

D = diferentes reações em diferentes espécies de um gênero; d = diferentes reações em diferentes isolados; (d) = diferentes reações em diferentes isolados tardiamente; X = reações tardias e irregularmente positivas (mutantes); (+) = reações tardias, mas sempre positivas; ((+)) = liquefação muito lenta.

Para a identificação de *E. coli* patogênicas, foi extraído o DNA microbiano segundo a técnica proposta por Keskimaki et al. (2001) com pequenas modificações. As alíquotas de água peptonada de cada amostra, semeadas em um tubo de ensaio contendo 1 mL de caldo BHI foram incubadas “overnight” a 37°C. A cultura foi centrifugada a 15.000 G em tubo eppendorf® para a precipitação das células e descarte do sobrenadante. As células precipitadas foram ressuspensas em 250µL de água Milli-Q estéril e agitadas em vórtex por 30 segundos.

As amostras confirmadas e isoladas de *E. coli* para STEC, EPEC, ETEC, EIEC e EAEC foi realizado a PCR separadamente para cada patótipo de *E. coli*. Para STEC e EPEC foram utilizados os genes stx1, stx2 e eae, para EPEC utilizou-se os genes eae e bfp, para

EPEC utilizou-se os genes *estA*, *estB*, *elt* e *f4*, para EIEC utilizou-se os genes *virF* e *ipaH* e para EAEC utilizou-se os genes *aafII* e *aggR*.

Para a detecção dos grupos filogenéticos foi realizada a identificação dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2 e para os isolados positivos foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores segundo proposto por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000), seguindo árvore dicotômica (Figura 12).

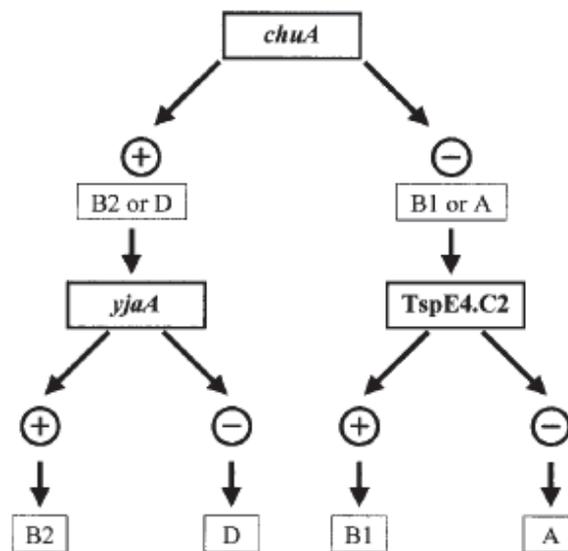


Figura 12. Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético cepa de *E. coli*, utilizando os resultados da PCR dos genes *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2

As reações foram submetidas com termociclador com ciclos de acordo com a os *primers* utilizados supracitados (Figura 13). Os produtos amplificados foram então visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, e usado como referência, um marcador de peso molecular conhecido (100 pb DNA Ladder - Invitrogen®) e o tamanho do produto amplificado e suas respectivas temperaturas de pareamento e controles positivos foram descritos na Tabela 2.

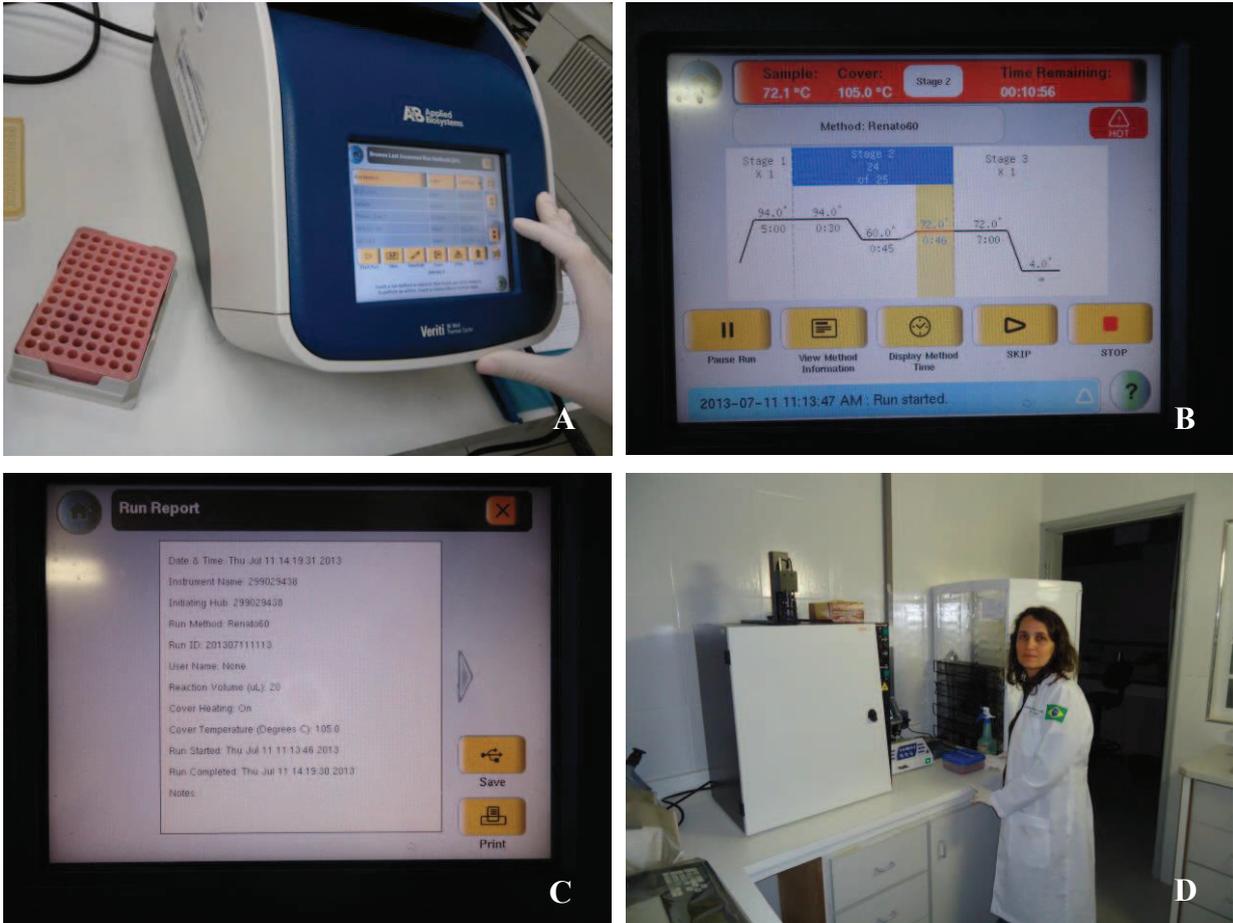


Figura 13: Processo de amplificação da Reação de Cadeia da Polimerase - PCR de *Escherichia coli*. A: Aparelho termociclador; B: Tela de etapas da termociclagem; C: Especificações dos ciclos realizados; D: Coloração do gel com brometo.

Tabela 2. Nucleotídeos iniciadores (NI), tamanho do produto de amplificação (TPA) e suas respectivas temperaturas de pareamento (TP).

Gene(s)	Tamanho do fragmento (pb)	Temp. (°C)	Controle Positivo	Referência
sfaD/E	410	60	FVL16	(LE BOUGUENEC, ARCHAMBAUD e LABIGNE, 1992)
papC	200	60	FVL16	(JOHNSON e STELL, 2000)
Afa	809	60	FVL35	(EWERS et al., 2007)
iutA	302	62	APEC01	(JOHNSON e STELL, 2000)
iucA	1100	55	FVL16	(SAVARINO et al., 1991)
kpsMTII	269	60	APECO1	(JOHNSON e STELL, 2000)
Stx1	348	60	EcL661	(CEBULA, PAYNE e FENG, 1995)
Stx2	584	60	EcL661	(CEBULA, PAYNE e FENG, 1995)
EAE	482	60	EcL661	(STACY-PHIPPS, MECCA e WEISS, 1995)
It	218	60	EcL780	(STACY-PHIPPS, MECCA e WEISS, 1995)
stII	129	60		(STACY-PHIPPS, MECCA e WEISS, 1995)

Legenda: Temp. = temperatura.

3.4.2.1.2 *Salmonella* spp.

O material fecal do swab retal foi submetido ao processo de pré-enriquecimento (Água Peptonada) e enriquecimento seletivo (Caldos Rappaport e Tetrathionato). Posteriormente, as amostras foram semeadas em meios semi-sólidos (ágar XLD e Verde Brilhante), com intuito de visualizar o crescimento de colônias característica do gênero.

3.4.2.2 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

As colônias com crescimento bacteriano foram submetidas a testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* qualitativos expressando os resultados em sensível, intermediário ou resistente. Para se obter este resultado foi utilizado o teste de difusão em disco. Os antibióticos escolhidos para o teste de sensibilidade fora de acordo com os fármacos utilizados na rotina clínica do CMA/ICMBio. Foram testadas a sensibilidade para os antibióticos neomicina, ampicilina, amoxicilina, penicilina, tetraciclina, norfloxacina, gentamicina e eritromicina (Figura 14).

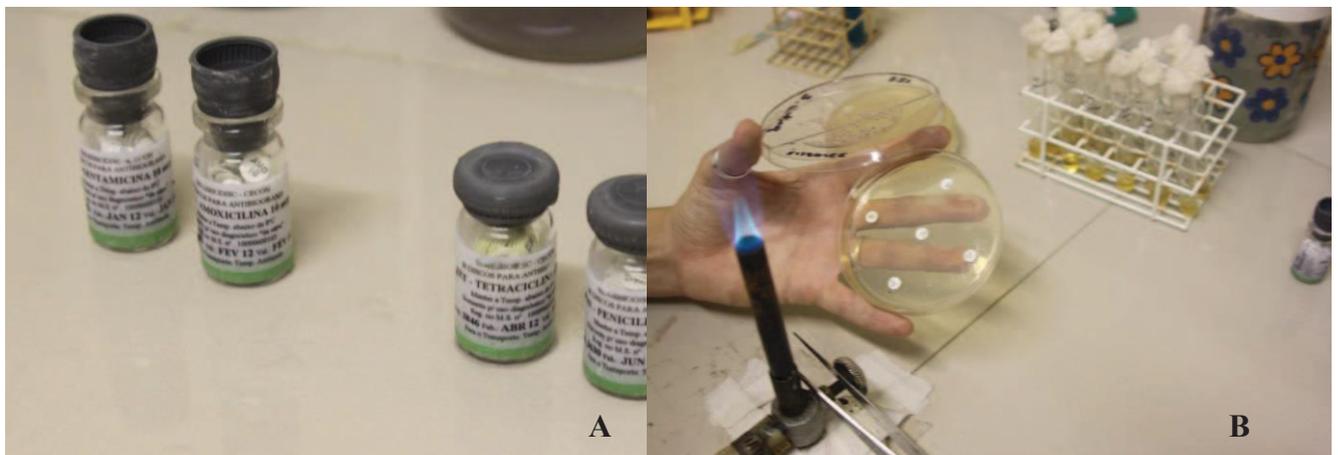


Figura 14: Teste em disco de sensibilidade de antibióticos. A) Disco de sensibilidade antimicrobiana CECON[®]; B) Placa de Petri impregnada com a bactéria e inseridos os discos de sensibilidade.

3.4.3 Exames Sorológicos

3.4.3.1 Pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp

O exame sorológico foi realizado no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS-FMVZ/USP em São Paulo/SP sob supervisão do Professor Doutor José Soares Ferreira Neto.

Os soros sanguíneos dos animais foram examinados por meio da Microtécnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) (COLE; SULZER e PURSELL, 1973; BRASIL, 1995) com uma coleção de 24 estirpes de leptospiros vivas que incluirá os sorovares: Andamana, Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Butembo, Canicola, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Grippotyphosa, Hardjo (hardjoprajtino), Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Sentot, Shermani, Tarassovi, Whitcombi e

Wolffi. Os antígenos foram mantidos em meio líquido de EMJH modificado. Os soros dos animais foram triados na diluição de 1:100 (diluição de corte).

3.4.3.2 Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* spp.

Os exames sorológicos foram realizados no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS-FMVZ/USP, São Paulo/SP sob supervisão do Professor Doutor José Soares Ferreira Neto.

Para pesquisa de anticorpos anti-*Brucella abortus* foi realizada a triagem com o Teste de Rosa Bengala (TRB) com antígeno acidificado tamponado (AAT) utilizando como antígeno *Brucella abortus* (cepa 1119-3) (Figura 15) (ALTON et al., 1976, BRASIL, 2013). Este teste de soroaglutinação classificou os animais como positivos ou negativos (KRUZE, 1975; OMS, 1986).

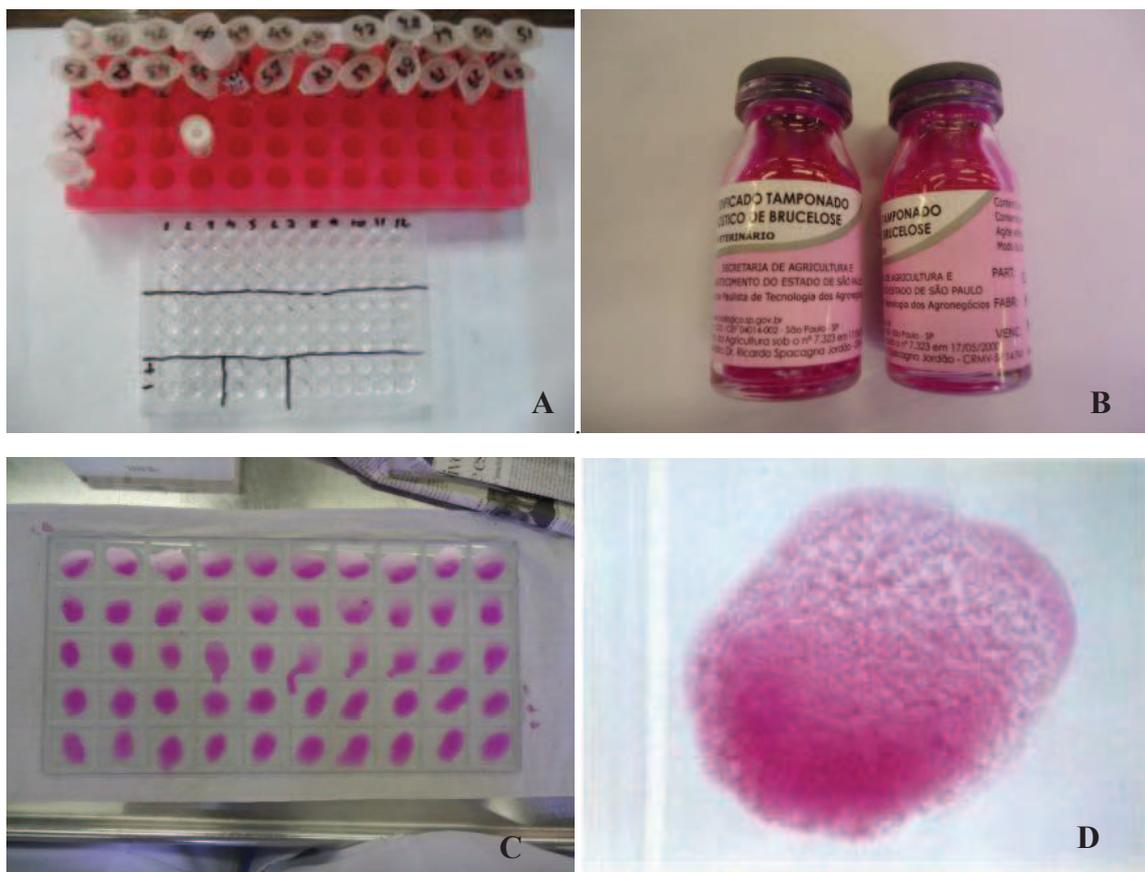


Figura 15: Etapas do teste sorológico de rosa bengala para a triagem das amostras para *Brucella abortus*. A: Amostra sorológica para a análise anti-*Brucella abortus*; B: Antígeno utilizado para a triagem de soropositivos para *Brucella abortus* na realização do teste de rosa bengala; C: Placa de

vidro com marcações quadriculares para a mistura de soro com antígeno e para visualização da soroaglutinação, quando positivos; D: Exemplo de visualização de soroaglutinação positiva.

3.4.3.3 Pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

O exame sorológico foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE, Recife/PE sob a supervisão do Professor Doutor Jean Carlos Ramos Silva e no Laboratório de Doenças Parasitárias do VPS-FMVZ/USP, São Paulo/SP sob a supervisão da Professora Doutora Solange Maria Gennari. Para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* utilizou-se o Teste de Aglutinação Modificada (MAT) com taquizoítos inativados na formalina e 2-mercaptoetanol. O ponto de corte foi estabelecido em título 25, representando indicação de infecção passada pelo *T. gondii* (DUBEY et al., 2003; CABEZÓN et al., 2004). O título foi determinado pela maior diluição na qual houve aglutinação (Figura 16).

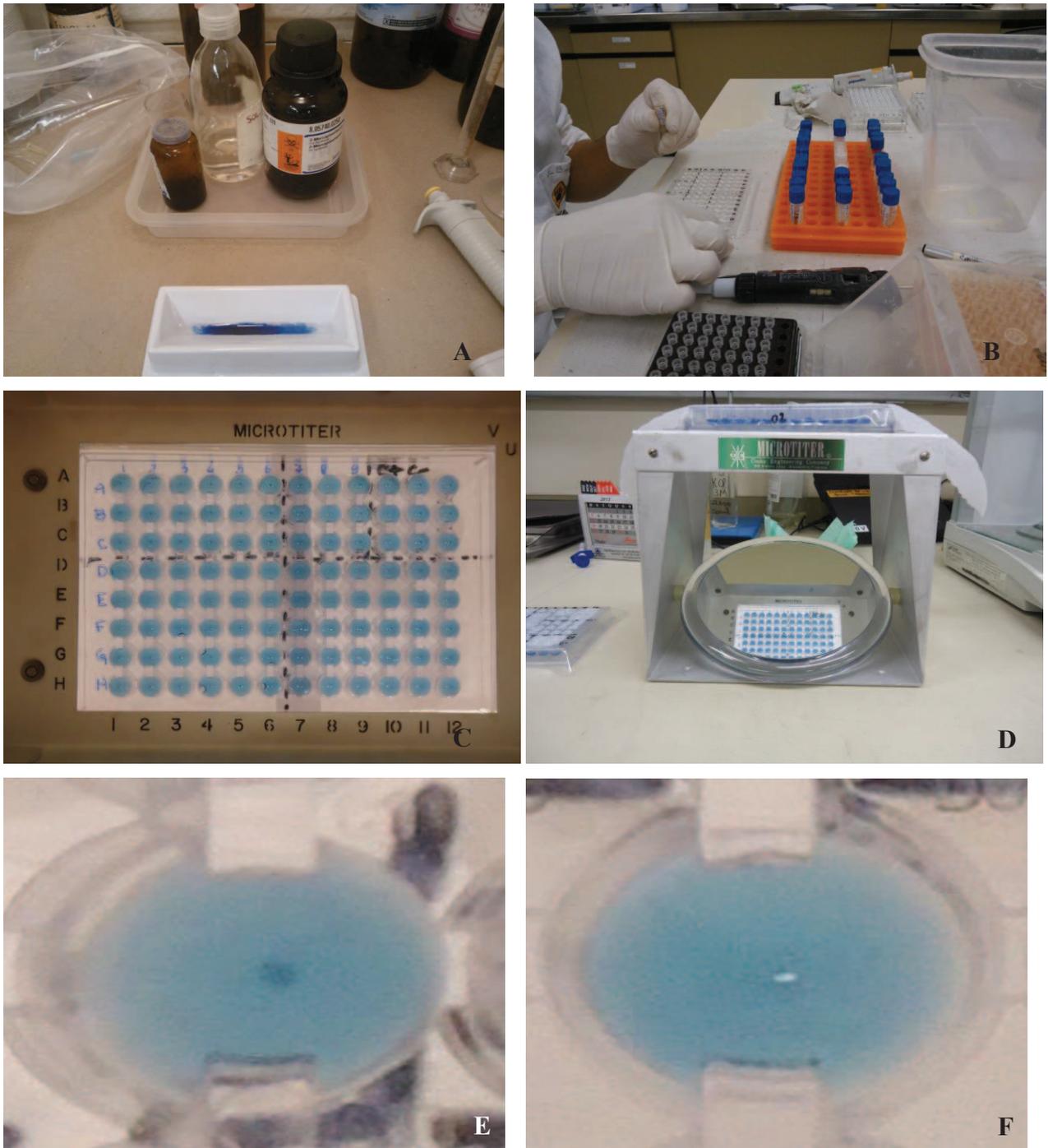


Figura 16: Etapas de realização do Teste de Aglutinação Modificada (MAT) para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*. A: kit de materiais para a realização do MAT; B: amostras sendo preparadas nas microplacas em “U”; C: microplaca para leitura do MAT após over night, mostrando a divisão da placa por amostras; D: Suporte e microplaca para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*; E: Leitura negativa para a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* demonstrando a aglutinação no fundo da placa; F: Leitura positiva pra a detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.5.1 Análise de Sobrevida

A análise de sobrevida foi realizada no Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística do VPS-FMVZ/USP, São Paulo/SP sob supervisão do Professor Doutor Ricardo Augusto Dias.

3.5.1.1 Permanência dos Peixes-Bois Marinhos no CRAS/PE

O tempo de permanência dos animais no CRAS/PE foi calculado a partir da data da admissão dos animais (sejam eles capturados em encalhes nas praias ou estuários e, posteriormente, encaminhados ao CRAS/PE ou nascidos no próprio CRAS/PE) e a data da saída dos animais (seja por óbito ou translocação para outro local). O tempo de permanência foi calculado em dias, entre 01 de janeiro de 1987 e 31 de dezembro de 2013. Não foram incluídos os animais resgatados mortos, entretanto os natimortos foram incluídos, pois a reprodução destes animais ocorreu em cativeiro.

A análise de sobrevida (permanência no CRAS/PE) dos animais foi realizada por meio da determinação da tábua de vida e da função de sobrevida considerando-se períodos de um ano para a análise cumulativa. A análise foi estratificada para sexo (fêmea e macho) e destino (translocação ou não), sendo a mediana do tempo de sobrevida comparada através da análise de Kaplan-Meier.

Para a verificação da destinação dos animais (óbito, translocados, reintroduzidos ou em cativeiro) foram considerados somente os animais que chegaram vivo no CRAS/PE.

Considerou-se como evento de sucesso (evento estudado) a mortalidade dos animais no CRAS/PE e a translocação para outros locais.

A distribuição dos tempos de permanência foi determinada através da elaboração de um histograma, sendo verificado se a distribuição era normal através do teste de Kolmogorov-Smirnov. As medianas dos tempos de permanência entre animais reintroduzidos e não reintroduzidos foram comparadas através do teste de Mann-Whitney.

As análises foram realizadas no programa de computador SPSS 9.0.

3.5.1.2 Mortalidade de animais no CRAS/PE

O tempo de permanência dos animais no CRAS/PE até o eventual óbito foi calculado a partir da data da admissão dos animais (sejam eles capturados em encalhes nas praias ou estuários e, posteriormente, encaminhados ao CRAS/PE ou nascidos no próprio CRAS/PE) e a data do óbito. O tempo de permanência foi calculado em dias, entre 01 de janeiro de 1987 a 31 de dezembro de 2013.

Foi realizada a análise de sobrevivência (mortalidade no CRAS/PE) dos animais através da determinação da tábua de vida e da função de sobrevivência considerando-se períodos de um ano para a análise cumulativa. A análise foi estratificada para sexo (fêmea e macho), sendo a mediana do tempo de sobrevivência comparada através da análise de Kaplan-Meier.

Considerou-se como evento de sucesso somente a mortalidade dos animais no CRAS/PE.

A distribuição do tempo de permanência até o óbito foi determinada através da elaboração de um histograma, sendo verificado se a distribuição era normal através do teste de Kolmogorov-Smirnov. As medianas do tempo de permanência até o óbito entre animais reintroduzidos não foram comparadas através do teste de Mann-Whitney.

Foi realizada uma análise de correlação entre os dados da população de animais e o número de óbitos entre 2003 e 2013, utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson.

As análises foram realizadas no programa de computador SPSS 9.0.

3.5.2 Estudos de prevalência

Foi calculada a prevalência por períodos de um ano, de 2003 a 2013 somente no CRAS/PE. Para isso, o número total de animais alojados foi calculado para cada ano e, considerando-se o número de animais amostrados, foi calculado o intervalo de confiança destas estimativas utilizando-se o programa de computador EpiTools, utilizando o método binomial exato e nível de confiança de 95%.

Para os animais sem registro de saída do CRAS/PE foi considerado como tempo de alojamento somente o ano de entrada no CRAS/PE, uma vez que estes animais não possuíam data de saída, seja por óbito ou translocação foram portanto considerados ainda presentes no CRAS/PE.

Para os animais que tiveram mais de uma amostra colhida em cada ano, foi considerada uma única amostra. Caso houvesse ao menos uma amostra positiva, o animal foi

considerado positivo. Caso todas as amostras fossem negativas, foi considerado negativo. No caso de titulações, foi considerado o último teste do ano em questão.

Para cada agente estudado foi realizado o estudo de prevalência das amostras analisadas, independentemente das prevalências do CRAS/PE.

4 RESULTADOS

As análises dos resultados foram realizadas de acordo com a presença ou ausência dos patógenos pesquisados, porcentagem de animais soropositivos para a presença de anticorpos e na análise da sobrevida. Ao todo, foram analisados 94 peixes-bois marinhos para a análise de sobrevida, 19 animais para pesquisa de rotavírus e coronavírus, 30 animais para o isolamento de enterobactérias, 16 animais para análise molecular pela PCR para pesquisa de *Escherichia coli*, 58 animais para pesquisa de anticorpos anti-*B. abortus*, 55 animais para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* e animais 54 para pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. (Apêndice B).

Os resultados de enterobactérias e de teste de sensibilidade foram compilados no Apêndice C.

4.1 Pesquisa de Agentes Virais

4.1.1 Rotavírus

Dos 18 animais avaliados, 10 (55,5%) foram verificados com a presença do vírus (Figura 17). Dentre os positivos, 30% (3/10) eram fêmeas e 70% (7/10) machos. Quanto a faixa etária, 50% (5/10) eram filhotes, 20% (2/10) juvenis e 30% (3/10) adultos.

Com relação à origem, 80% (8/10) dos animais eram do CRAS/PE e 20% (2/10) do CRAS/AL.

4.1.2 Coronavírus

Todas as amostras fecais foram negativas para coronavírus, não tendo sido observado este agente nas amostras analisadas.

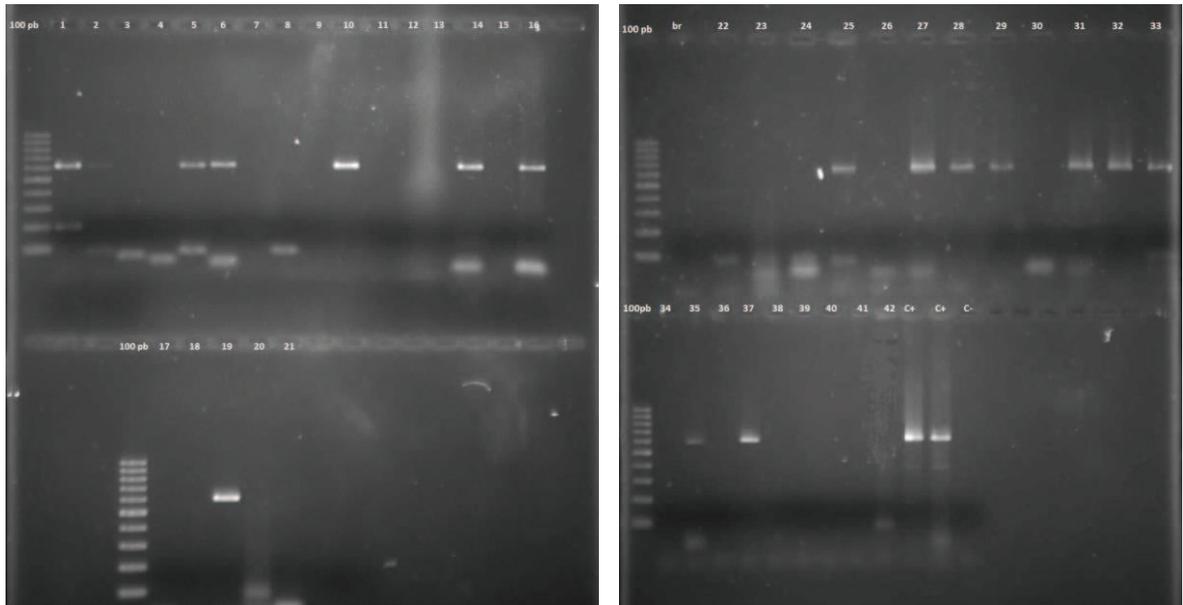


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA com as cepas de rotavírus amplificados pela Reação de Cadeia da Polimerase (PCR). A migração ocorreu de cima para baixo e o tamanho dos produtos de amplificação estão visualizados à esquerda.

4.2 Pesquisa de Agentes Bacterianos

4.2.1 Enterobactérias

Dentre as análises das enterobactérias, 20 (66,7%) foram identificados com ao menos uma bactéria. *E. coli* foi predominantemente a bactéria mais encontrada (Tabela 3), sendo por esta razão realizada a tentativa de identificação deste grupo de bactérias pela análise molecular pela PCR.

As bactérias encontradas foram *Escherichia coli* (25,8%, 34/132); *Enterobacter aerogenes* (12,9%, 17/132), *Pseudomonas* sp. (11,4%, 15/132), *Staphylococcus* sp. (9,1%, 12/132), *Edwasiella tarda* (7,6%, 10/132), *Enterobacter agglomerans* (6,1%, 8/132), *Proteus* sp (5,3%, 7/132), *Proteus vulgaris* (4,5%, 6/132), *Corinebacterium* sp. (3,8%, 5/132), *Streptococcus* sp. (3,8%, 5/132), *Providencia* sp. (3%, 4/132), *Arizona* sp. (1,5%, 2/132), *Enterobacter sakazaki* (1,5%, 2/132), *Klebsiella* sp. (1,5%, 2/132), *Bacillus* sp. (0,8%, 1/132), *Citrobacter* sp. (0,8%, 1/132) e *Enterobacter* sp. (0,8%, 1/132).

Tabela 3: Enterobactérias encontradas nos swabs de peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) cativos do Brasil, demonstrando a quantidade de bactérias isoladas em cada tipo de swab e a quantidade isolada de cada bactéria.

Agente Etiológico	Nasal	Oral	Genital	Retal	Abscessos	Total
<i>Arizona</i> sp.	1	1	0	0	0	2
<i>Bacillus</i> sp.	1	0	0	0	0	1
<i>Citrobacter</i> sp.	0	0	0	1	0	1
<i>Corynebacterium</i> sp.	2	2	0	1	0	5
<i>E. coli</i>	8	5	2	16	3	34
<i>Edwasiella tarda</i>	4	4	1	1	0	10
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	11	2	1	0	17
<i>Enterobacter agglomerans</i>	5	2	1	0	0	8
<i>Enterobacter sakazaki</i>	0	2	0	0	0	2
<i>Enterobacter</i> sp.	1	0	1	0	0	2
<i>Klebsiella</i> sp.	0	2	0	0	0	2
<i>Proteus</i> sp.	5	0	0	2	1	8
<i>Proteus vulgaris</i>	2	0	2	2	0	6
<i>Providencia</i> sp.	1	1	0	2	0	4
<i>Pseudomonas</i> sp.	14	1	0	0	0	15
<i>Staphylococcus</i> sp.	3	4	2	0	3	12
<i>Streptococcus</i> sp.	0	4	1	0	0	5
Total	50	39	12	26	7	

Em todos os locais de colheita de swabs e nos animais foram encontrados *E. coli*, sendo que 47,1% (16/34) destas foram encontradas nos swabs retais, 32,4% (11/34) nos swabs nasais; e em 14,7% (5/34) nos swabs orais, 8,8% (3/34) e nos casos de animais com abscessos.

As bactérias encontradas nos abscessos foram *Staphylococcus* sp. (42,9%, 3/7), *E. coli* (42,9%, 3/7) e *Proteus* sp. (14,3%, 1/7). Um animal apresentou recidiva durante todo o experimento, no entanto os achados foram semelhantes em todas as ocasiões.

Nos swabs retais foram encontradas 61,5% (16/26) de *E. coli*, *Proteus* sp. 7,7% (2/26), *Proteus vulgaris* 7,7% (2/26), *Providencia* sp. 7,7% (2/26), *Citrobacter* sp. 3,8% (1/26), *Corynebacterium* sp. 3,8% (1/26), *Edwasiella tarda*. 3,8% (1/26) e *Enterobacter aerogenes* 3,8% (1/26).

Entre os swabs genitais, foram encontradas 16,7% (2/12) de *E. coli*, 16,7% (2/12) de *Staphylococcus* sp., 16,7% (2/12) de *Enterobacter aerogenes*, 16,7% (2/12) de *Proteus vulgaris*, 8,3% (1/12) de *Edwasiella tarda*, 8,3% (1/12) de *Enterobacter agglomerans*, 8,3% (1/12) de *Enterobacter* sp, 8,3% (1/12) de *Streptococcus* sp.

Nas amostras colhidas do swab nasal foram identificadas as seguintes: *Pseudomonas* sp. (28%; 14/50), *E. coli* (16%; 8/50), *Enterobacter agglomerans* (10%; 5/50), *Proteus* sp. (10%; 5/50), *Edwasiella tarda* (8%; 4/50), *Enterobacter aerogenes* sp. (6%; 3/50), *Staphylococcus* sp. (6%; 3/50), *Corynebacterium* sp. (4%; 2/50), *Proteus vulgaris* (4%; 2/50), *Arizona* sp. (2%; 1/50), *Bacillus* sp. (2%; 1/50), *Enterobacter* sp. (2%; 1/50), *Providencia* sp. (2%; 1/50).

Nos swabs orais foram isoladas 28,2% (11/39) de *Enterobacter aerogenes*, 10,3% (4/39) de *Edwasiella tarda*, 12,8% (5/39) de *E. coli*, 10,3% (4/39) de *Staphylococcus* sp., 10,3% (4/39) de *Streptococcus* sp., 5,1% (2/39) de *Corynebacterium* sp., 5,1% (2/39) de *Enterobacter agglomerans*, 5,1% (2/39) de *Enterobacter sakazaki*, 5,1% (2/39) de *Klebsiella* sp., 2,6% (1/39) de *Arizona* sp., 2,6% (1/39) de *Providencia* sp. e 2,6% (1/39) de *Pseudomonas* sp.

4.2.1.1 *Escherichia coli*

As amostras para identificação de *E. coli* patogênica foram positivas, ou seja, houve identificação utilizando os *primers* em 11 amostras (Tabela 4), sendo uma para *Stec*, uma para *ETEC*, uma para *EPEC* e oito para *ExPEC* (2 *kpsMTII*, 1 *papC*, 1 *afa* e 2 *sfA*) (Figura 18).

Para a filogenia, seis amostras pertenceram ao grupo A, três ao grupo D, três B1 e três B2.

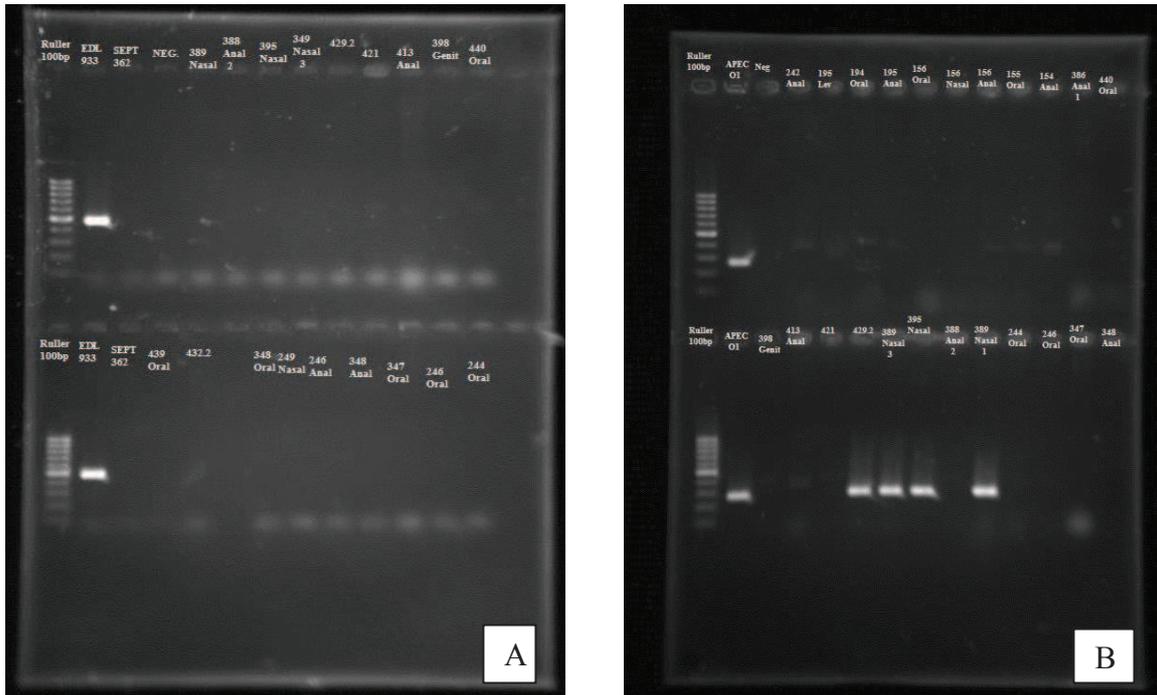


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA para análise de *Escherichia coli* amplificados pela Reação de Cadeia da Polimerase (PCR). A migração ocorreu de cima para baixo e o tamanho dos produtos de amplificação estão visualizados à esquerda. Foram utilizados os *primers*. A: *primer* EAE; B: *primer* kpx/stx.

4.2.1.2 *Salmonella* spp.

Neste estudo a bactéria *Salmonella* spp. não foi isolada em nenhuma das amostras analisadas.

4.2.2 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

Todas as amostras testadas demonstraram resistência para ao menos um antibiótico. Nos testes de sensibilidade antimicrobiana realizados 67,4% (426/632) foram resistentes, enquanto que 26,7% (169/632) foram sensíveis e 5,9% (37/632) apresentaram uma sensibilidade intermediária.

O antibiótico com maior resistência apresentado foi a penicilina com 81,3% (100/123) das amostras testadas apresentando resistência, seguida da eritromicina com 74,7% (56/75), amoxicilina com 74%, (91/123), ampicilina 67,5% (83/123), gentamicina com 61,5% (40/65) e a com menor resistência a tetraciclina com 45,5% (56/123).

Nas amostras isoladas de abscessos, 97,1% (34/35) foram resistentes aos antibióticos testados e somente 2,9% (1/35) foi sensível a um único antibiótico, a gentamicina. Dentre as

bactérias encontradas nos swabs retais 69,5% (73/105) foram resistentes seguidas respectivamente por 69% (165/239) nos swabs nasais, 67,3% (37/55) nos swabs genitais e 59,1% (117/198) nos swabs orais.

4.3 Exames Sorológicos

Nos exames sorológicos realizados verificou-se uma co-infecção com a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e anti-*T. gondii*. O animal foi uma fêmea adulta cativa no CRAS/PE.

4.3.1 Pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp.

Dentre 54 peixes-boi marinhos examinados, 5 (9,2 %) foram soropositivos para anticorpos anti-*Leptospira* spp. Os sorovares encontrados foram: Australis, Autumnalis, Bataviae, Brastislava, Butembo, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Panama e Pomona. Os sorovares mais prevalentes com respectivos títulos foram: Australis (1600), Autumnalis (800), Bataviae (200), Brastislava (800) e Icterohaemorrhagiae (1600). A Tabela 5 mostra os resultados dos animais soropositivos segundo identificação, sexo, data de colheita, origem e sorovares encontrados. Somente os cativeiros (CRAS) de Alagoas e Pernambuco apresentaram animais soropositivos.

Com relação ao sexo, dentre os 28 machos examinados, 3 (10,7%) foram soropositivos e das 26 fêmeas, 2 (7,7%) foram soropositivas. Todos os peixes-bois marinhos soropositivos eram adultos. De acordo com a origem, dois (5,3%) dos 38 “animais em reabilitação” no CRAS/PE e três (18,7%) dos 16 “animais em adaptação” nos CRAS/AL foram soropositivos. No CRAS/PB todos os quatro foram soronegativos.

Tabela 5: Peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) em cativeiro adultos soropositivos para anticorpos anti-*Leptospira* spp., segundo identificação, sexo, data de colheita, origem e sorovares encontrados. Brasil, 2014.

ID	SEXO	DATA	PROCEDÊNCIA	Sorovares								
				Icterohaemorrhagiae	Butembo	Brasilava	Australis	Pomona	Copenhageni	Autumnalis	Panama	Bataviae
7	M	17/08/2009	CRAS/PE	200	100	-	800	-	-	-	-	-
14	F	09/09/2009	CRAS/AL	400	200	800	400	-	100	200	-	-
14	F	28/01/2010	CRAS/AL	400	-	800	400	200	-	400	400	-
18	M	02/04/2013	CRAS/AL	-	-	-	-	100	-	-	-	-
18	M	26/02/2013	CRAS/AL	-	-	-	-	-	-	-	-	200
18	M	19/03/2013	CRAS/AL	1600	-	-	-	-	-	-	-	-
18	M	26/03/2013	CRAS/AL	-	-	-	800	-	-	-	-	-
18	M	23/05/2013	CRAS/AL	100	-	-	800	-	-	-	-	-
20	M	21/03/2012	CRAS/PE	100	-	-	-	-	-	-	-	-
28	F	02/06/2010	CRAS/PE	100	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: ID: identificação do peixe-boi marinho na pesquisa. M: macho, F: Fêmea. CRAS/PE: Centro de Reabilitação de Animais Silvestres de Pernambuco, CRAS/AL: Centro de Reabilitação de Animais Silvestres de Alagoas.

4.3.2 Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* spp.

Dentre os animais analisados, cinco foram positivos no exame de triagem com o Teste de Rosa Bengala (Teste do Antígeno Acidificado), sendo quatro fêmeas e um macho, todos adultos, dois oriundos do CRAS/PE e dois do CRAS/PB foram soropositivos. Entretanto, no exame confirmatório realizado com o Teste de Fixação de Complemento, todas estas amostras foram negativas, sendo então considerados animais soronegativos.

4.3.3 Pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

Dos 55 peixes-boi marinhos examinados, 6 (10,9 %) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* com títulos de 50 (três animais), 500 (um animal), 3200 (um animal) e 25600 (um animal), sendo três machos e três fêmeas, dois jovens e quatro adultos. Considerando a origem dos peixes-boi marinhos a soropositividade foi: CRAS/AL 16,7% (2/12), CRAS/PE 10,5% (4/38) e nenhum no CRAS/PB.

4.4 Análise de Sobrevida

4.4.1 Permanência dos Peixes-Bois Marinhos no CRAS/PE

Foram alojados 94 indivíduos diferentes entre 1987 e 2013, sendo 44 (47,8%) fêmeas e 50 (53,2%) machos de faixas etárias variadas, sendo que seis destes animais foram animais natimortos nascidos em cativeiro. Entretanto, para as análises de sobrevida, foram considerados 91 peixes-bois marinhos, pois não foi possível determinar o tempo de permanência para três indivíduos. Para sete indivíduos, não havia registro do dia exato do óbito ou translocação, somente o mês, sendo atribuído o dia 15 do mês correspondente.

Observou-se, na população geral, que o número de animais alojados no CRAS/PE reduziu-se acentuadamente até o oitavo ano de permanência, estabilizando-se ao redor de 15% após este período (Figura 19).

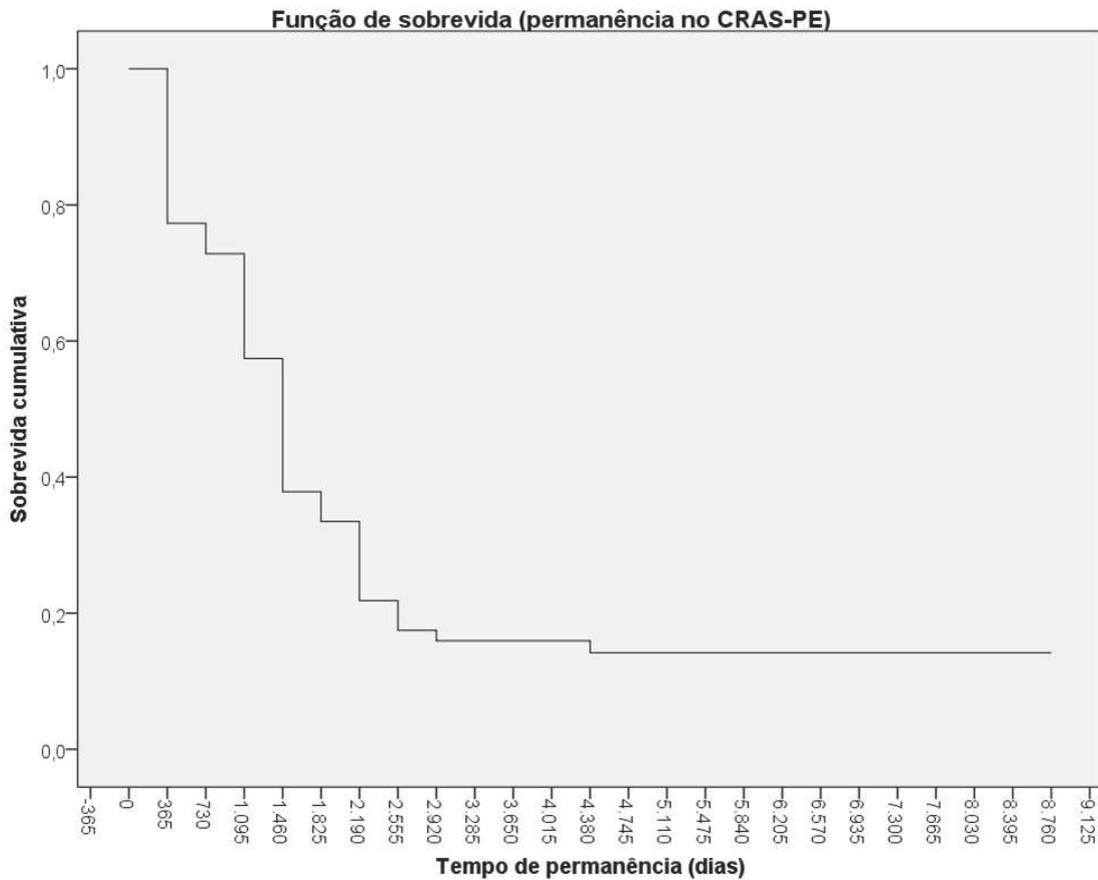


Figura 19. Função de sobrevivência do tempo de permanência de peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) alojados no CRAS/PE, no período de 1987 a 2013.

Uma vez que a distribuição dos dados de tempo de permanência não apresentou distribuição normal ($p < 0,001$), o tempo mediano de permanência dos animais no CRAS/PE foi de 1.267 dias (IC95% 1.033,5 – 1.500,5 dias).

Apesar de, na comparação dos sexos tanto graficamente (Figura 20) quanto através da observação da tábua de vida, o tempo de permanência estabilizar-se acima de 20% para fêmeas e abaixo de 10% para machos, não houve diferença significativa entre as funções de sobrevivência dos sexos ($p = 0,515$).

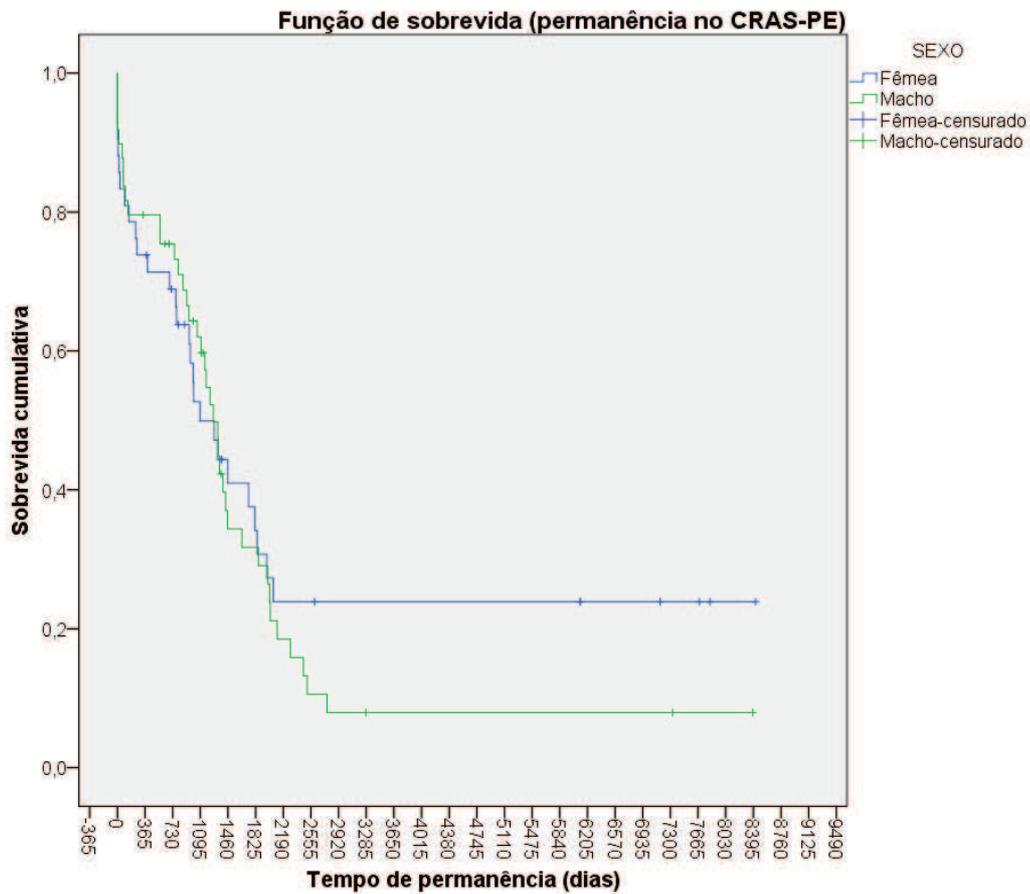


Figura 20. Função de sobrevivência do tempo de permanência de indivíduos fêmeas e machos de peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) alojados no CRAS/PE, no período de 1987 a 2013, diferenciando animais censurados.

Os tempos medianos de permanência de fêmeas e machos foram, respectivamente, 1.093 dias (IC95% 633,4 – 1.552,6 dias) e 1.267 dias (1.056,1 – 1.477,9 dias). Os dados de tempo de permanência de fêmeas e machos não apresentaram distribuição normal ($p = 0,002$ e $p = 0,019$, respectivamente).

Apesar de, graficamente (Figura 21) e através da observação da tábua de vida, o tempo de permanência de animais translocados não ultrapassar oito anos e se estabilizar ao redor de 35% até seis anos, não houve diferença significativa entre as funções de sobrevivência dos sexos ($p = 0,585$).

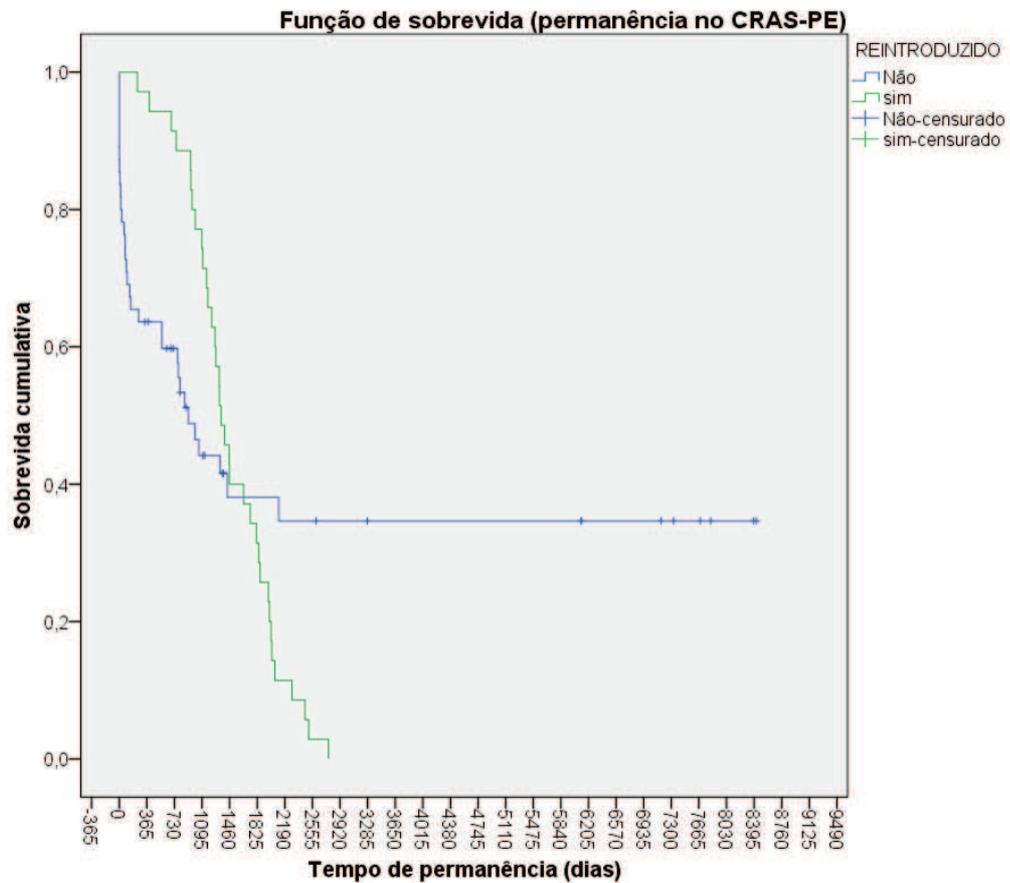


Figura 21. Função de sobrevivência do tempo de permanência de peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) alojados no CRAS/PE, segundo destino, no período de 1987 a 2013.

As medianas dos tempos de permanência de animais translocados e não translocados não foi computada, pois todos os dados foram censurados para os animais translocados.

4.4.2 Mortalidade dos Peixes-Bois Marinhos no CRAS/PE

Observou-se, na população geral, que a mortalidade dos animais cativos no CRAS/PE foi mais acentuada no primeiro ano de vida em cativeiro, sendo que a sobrevivência estabilizou-se ao redor de 65%, após o quarto ano de permanência (Figura 22).

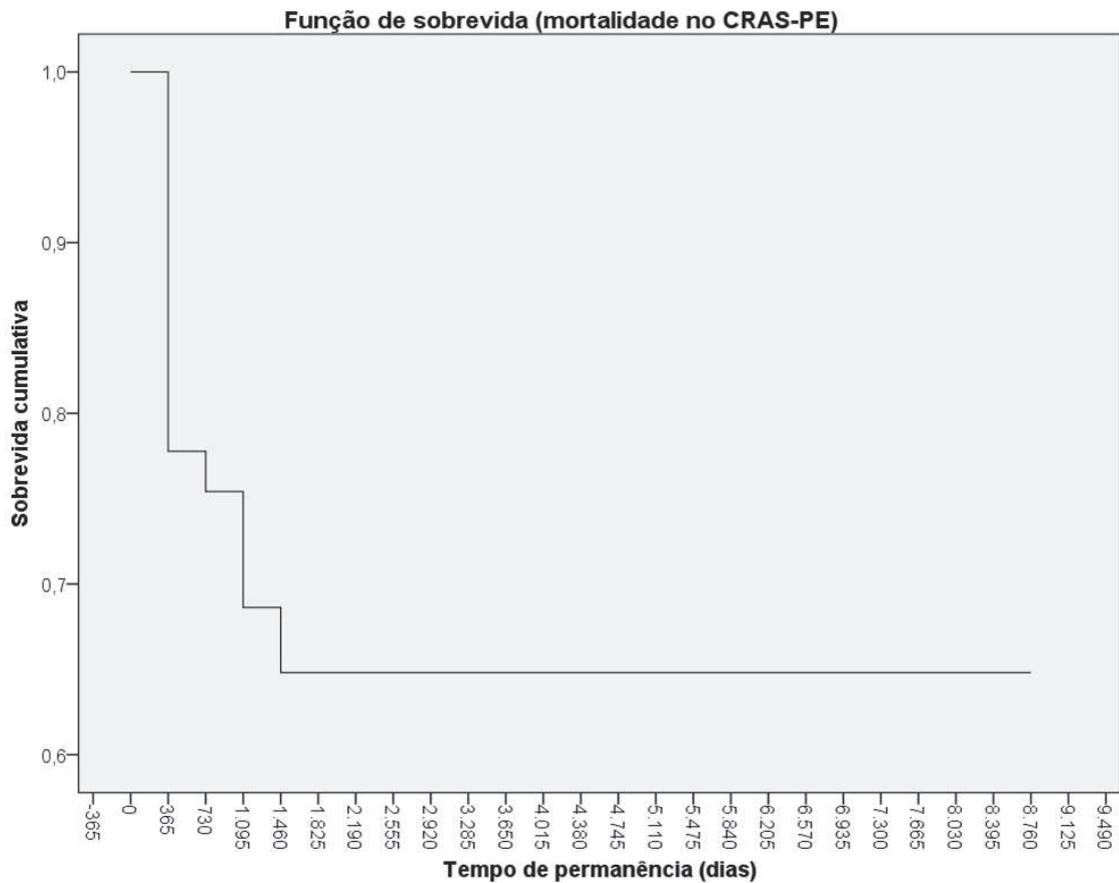


Figura 22. Função de sobrevivência do tempo de permanência até o óbito de peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) alojados no CRAS/PE, no período de 1987 a 2013.

Devido ao grande número de dados censurados, não foi possível calcular a mediana dos tempos de permanência até o óbito. O tempo médio de permanência dos animais até o óbito foi de 5.951 dias (IC95% = 4.766.5 – 7.135.5 dias).

O tempo mediano de permanência dos animais que morreram foi de 80 dias (IIQ = 1,5 – 668,5 dias) e dos animais que não morreram foi de 1.372,5 dias (IIQ = 960 – 2.071 dias), tendo sido observada diferença significativa ($p < 0,001$).

Apesar de, graficamente (Figura 23) e através da observação da tábua de vida, o tempo de permanência até o óbito estabilizar-se ao redor de 70% para fêmeas e ao redor de 60% para machos, não houve diferença significativa entre as funções de sobrevivência dos sexos ($p = 0,689$).

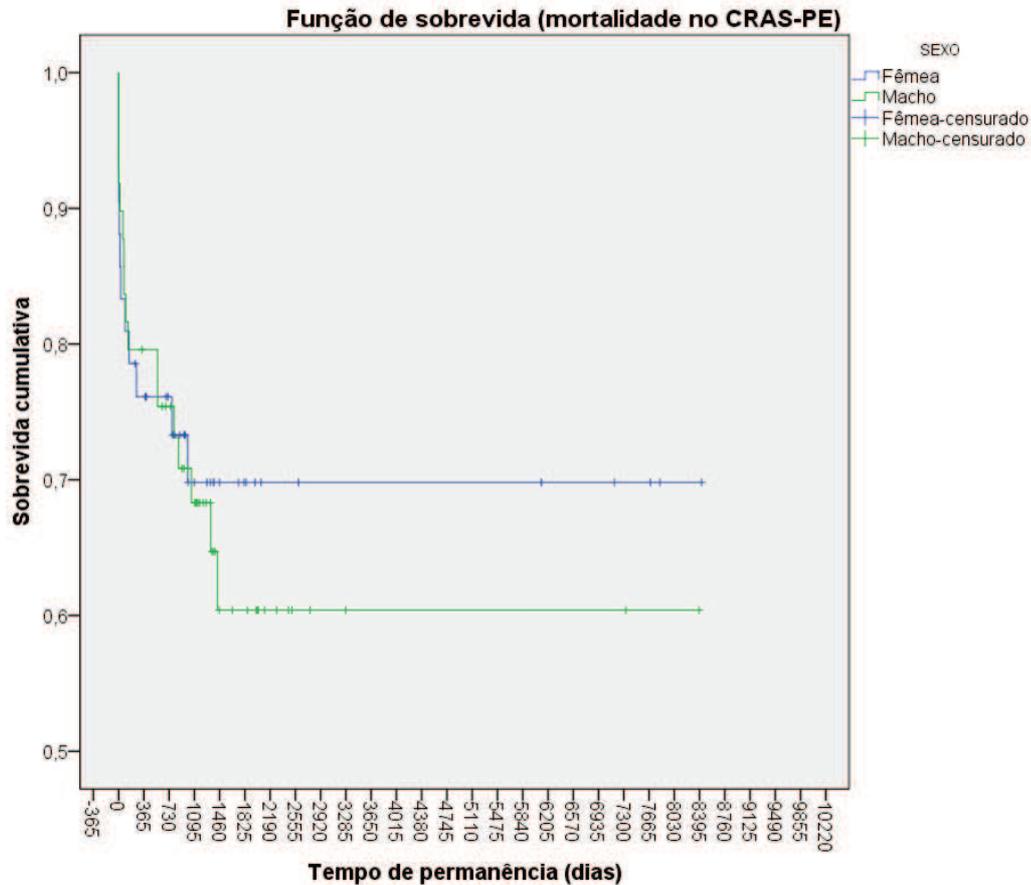


Figura 23. Função de sobrevivência do tempo de permanência até o óbito de indivíduos fêmeas e machos de peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) alojados no CRAS/PE, no período de 1987 a 2013.

Os tempos médios de permanência até o óbito foram 5.951 dias (IC95% = 4.766,5 – 7.135,5) e 5.273,8 (IC95% = 4.062,6 – 6.485,1 dias) para fêmeas e machos, respectivamente.

Não houve correlação entre o número de peixes-bois marinhos alojados e o número de óbitos, por ano, entre 2003 e 2013 ($p = 0,247$).

Quanto aos animais que chegaram vivo ao CMA/ICMBio (excluindo os natimortos), seja oriundo do resgate ou nascido em cativeiro, desde o início, foram manejados 89 animais, sendo que 40,4% (36/89) foram reintroduzidos, 28,1% (25/89) vieram à óbito no CRAS/PE; 4,5% (4/89) vieram à óbito nos cativeiros de readaptação, mas já haviam passado por todo o processo de reabilitação e 27% (24/89) encontram-se ainda no CRAS/PE (Figura 24).

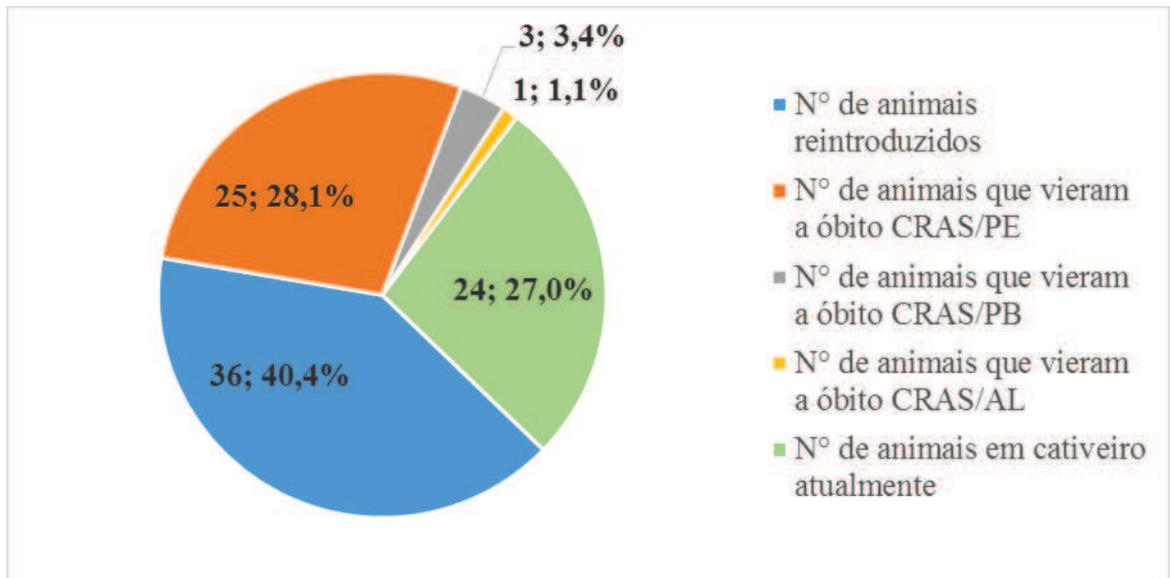


Figura 24: Gráfico da destinação dos animais do CRAS/PE considerando os animais atualmente cativos, os animais reintroduzidos e os que vieram à óbito nos três cativeiros do CMA/ICMBio.

Não foi analisado nesta pesquisa o sucesso pós-soltura, somente o sucesso de reabilitação dos animais resgatados para a reintrodução. Com isso, avaliando os animais que estiveram no CRAS/PE, 44,9% dos animais (40/89) foram aptos para a soltura e com isso translocados para um dos cativeiros de adaptação com a finalidade de reintrodução, 28,1% (25/89) estão ainda no CRAS/PE, porém com animais saudáveis, totalizando um sucesso de reabilitação de 73% (65/89) e um insucesso de 27% (24/89) animais que vieram à óbito no CRAS/PE antes da translocação (Figura 25).

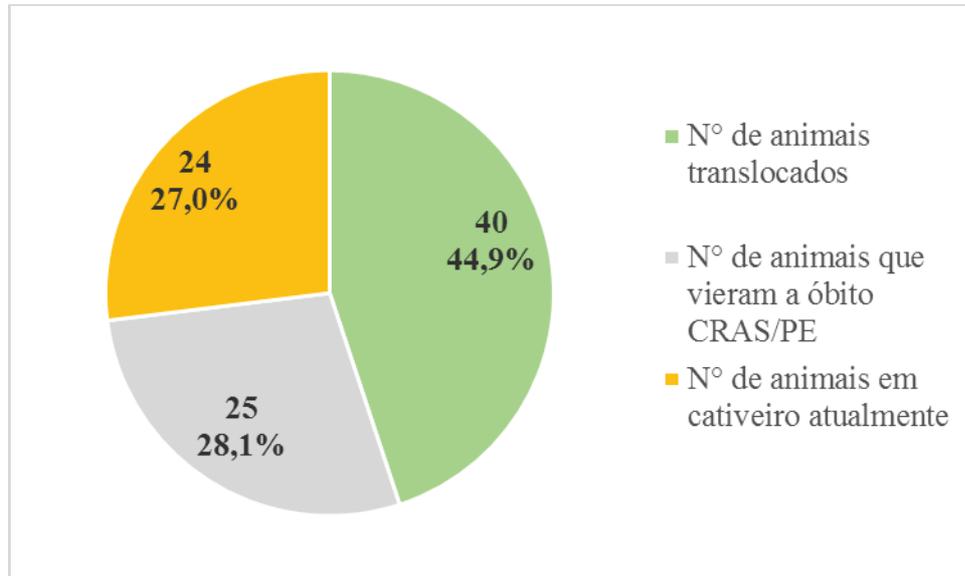


Figura 25: Gráfico de sucesso da reabilitação dos animais manejados vivos pelo CMA/ICMBio, demonstrando a destinação distribuídos em animais translocados, animais atualmente em cativeiro e animais que vieram à óbito.

4.4.3 Análise da Prevalência

As taxas de prevalências foram calculadas de acordo com o número de casos existentes no momento da pesquisa para a população de peixe-boi marinho cativa.

Devido ao baixo número de amostras e de resultados positivos, não foram feitas estratificações para a análise estatística.

5 DISCUSSÃO

Esta pesquisa representa a primeira investigação epidemiológica dos agentes etiológicos rotavírus, coronavírus, enterobactérias, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, da ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus*, anti-*Leptospira* spp. e anti-*Toxoplasma gondii* e da análise da sobrevivência e mortalidade de peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) mantidos em cativeiro do Brasil. Vale ressaltar a magnitude destes resultados, pois 100% (n=94) dos peixes-boi marinhos manejados pelo CMA/ICMBio em cativeiro no Brasil desde 1987 até o momento do término desta pesquisa em 31 de dezembro de 2013, foram analisados quanto a análise de sobrevivência. Além disso, o CRAS/PE localizado na Ilha de Itamaracá, Estado de Pernambuco serve de quarentenário para os filhotes resgatados com o objetivo de reintroduzi-los. Desta forma, este local juntamente com os “recintos de adaptação” dos CRAS/AL e CRAS/PB são importantes locais para a investigação de estudos epidemiológicos e para a conservação da espécie.

Em pesquisas anteriores realizadas com peixes-bois marinhos em cativeiro do Brasil verificou-se a presença de 46,42% (13/28) de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (BORGES et al., 2007), investigou-se bactérias do trato respiratório superior por meio da colheita de swab nasal em oito animais sendo isoladas 31 espécies no CRAS/PE e 15 espécies no CRAS/PB (VERGARA et al., 2003a), foi isolado *Salmonella* ssp. em um filhote (VERGARA et al., 2003b) e foram detectados anticorpos anti-*T. gondii* em um de 12 (8,3%) animais (SILVA et al., 2001). Todas estas pesquisas juntamente com a nossa são de relevância para um melhor entendimento da saúde dos indivíduos de peixes-bois marinhos cativos, da análise do manejo sanitário com vistas a elaboração de protocolos de biossegurança e da importância deste sítio como sentinela da saúde dos ecossistemas.

Na vida livre o aumento da ocorrência de doenças entre os animais silvestres está entre as maiores ameaças a biodiversidade, no entanto outros fatores também ligados ao meio ambiente e na maioria das vezes, em decorrência das ações humanas, quando somados podem levar a extinção de uma espécie (PRIMACK e RODRIGUES, 2001).

As doenças infecciosas, particularmente as virais, têm causado um grande número de óbitos em mamíferos marinhos levando-os a encalhar em diversas regiões do mundo. Nos episódios de encalhe em massa, entre as causas associadas estão as doenças infecciosas que afetaram todo o grupo (HALL e HARWOOD, 2002). Em peixes-bois marinhos encalhados no

Brasil esta causa é incomum estando mais associadas às questões antrópicas, entre elas a degradação ambiental, refletindo num encalhe de filhotes no litoral do nordeste do país (PARENTE, PARENTE e LIMA, 2004).

Da mesma forma, os peixes-bois marinhos em cativeiro no Brasil parecem não ter sido diretamente ameaçados pela presença de patógenos, pois estes não têm causado muitas doenças e nem óbito nos animais. Entretanto, sabendo-se da importância epidemiológica destes agentes etiológicos e o seu grande potencial patogênico é importante realizar o monitoramento e a vigilância. Sendo assim, as pesquisas científicas realizadas com peixes-bois marinhos em cativeiro poderá subsidiar as tomadas de decisões dos profissionais das instituições que mantém esta espécie em cativeiro. Vale ressaltar que o CMA/ICMBio foi a instituição que mais manejou em cativeiro e reintroduziu o peixe-boi marinho das Antilhas (*Trichechus manatus manatus*) em todo o mundo.

Mesmo com esta importante prática conservacionista, a Medicina da Conservação possui um grande dilema na soltura com relação à translocação dos espécimes de animais silvestres que necessitaram passar por um período no cativeiro. Se por um lado a reintrodução dessas espécies ameaçadas é necessária para o repovoamento da população, por outro, sempre haverá um risco de transmissão e disseminação de patógenos e doenças para a população nativa. Desta forma, torna-se de extrema importância a elaboração e utilização de protocolos para a avaliação da saúde das espécies ameaçadas de extinção tanto para a população em cativeiro, quanto em vida livre (CATÃO-DIAS, 2003). Os dados da presente pesquisa demonstraram que para os peixes-bois marinhos manejados pelos profissionais do CMA/ICMBio objetivando a sua reintrodução, foi fundamental o tempo em que tiveram em cativeiro, pois dentre os 89 animais manejados vivos pela instituição, 40,4% (36/89) foram reintroduzidos.

De acordo com Luna et al., 2008 a população estimada de peixe-boi marinho no Brasil são de 500 animais. Sendo assim, 18,8% de toda a população brasileira de peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) foi manejada pelo CMA/ICMBio e destes, 73% (65/89) dos animais manejados vivos obteve sucesso no CRAS/PE representando a reabilitação 13,0% da população da espécie.

Todavia, mesmo diante desses resultados positivos, por causa do isolamento de rotavírus e de enterobactérias, da presença de anticorpos anti-*Brucella abortus*, anti-*Leptospira* spp. e anti-*T. gondii* e dos trabalhos anteriormente realizados com outros agentes

citados anteriormente é importante revisar as atividades de prevenção e manejo desses patógenos no CMA-ICMBio e realizar a educação em saúde dos funcionários.

Os mamíferos aquáticos são importantes sentinelas ambientais e da saúde dos ecossistemas, pois além de possuírem grande expectativa de vida, estão em um alto nível trófico e presentes em todo o continente percorrendo diferentes regiões durante os períodos de locomoção, alimentação e reprodução (REDDY, DIERAUF e GULLAND, 2001; BOSSART, 2006; MOORE, 2008). Estes animais costumam ser encontrados também em cativeiro em todo o mundo com funções ora recreativas e ora conservacionistas, dependendo do objetivo da instituição no qual o animal se encontra. Contudo, Waltzek et. al. (2012) alertaram que independentemente da espécie, o aumento do número de animais em cativeiro eleva os casos de doenças, inclusive as zoonoses. Sendo assim, os peixes-bois marinhos cativos podem também se configurar como sentinelas do manejo sanitário dos recintos e do ambiente em que se encontram. Nesta pesquisa foram isolados rotavírus, *E. coli* e enterobactérias de interesse na saúde pública, a infecção dos animais soropositivos para anticorpos anti-*B. abortus*, anti-*Leptospira* spp. e anti-*T. gondii* sugerindo uma possível contaminação ambiental e, servindo de alerta para a necessidade de adoção de protocolos de exames diagnósticos no momento do resgate dos peixes-bois marinhos e durante a permanência dos indivíduos no cativeiro.

A ocorrência de infecções e doenças de potencial zoonótico tais como leptospirose, brucelose, toxoplasmose, salmonelose, rotavirose, entre outras, tem sido verificado cada vez mais frequentemente em mamíferos aquáticos (TRYLAND et al., 2013), refletindo em relatos de sua presença nos humanos, especialmente naqueles que trabalham diretamente com estes animais como médicos veterinários, biólogos, tratadores, entre outros (HUNT et al., 2008). Estes estudos evidenciam a importância dos achados dos agentes, pois eles possuem potencial zoonótico e devem ser investigados e controlados periodicamente nas instituições que mantêm peixe-boi em cativeiro, visando à saúde dos animais e da saúde pública.

A pouca literatura existente relacionada à doenças em mamíferos aquáticos, assim como as baixas prevalências encontradas em vários países, podem representar um panorama otimista que estes animais sejam menos suscetíveis a doenças infecciosas. No entanto, pode existir uma falta de conhecimento científico, melhores especificações nos relatórios técnicos (COWAN, HOUSE e HOUSE, 2001) e uma subnotificação da presença de patógenos, dos dados de morbidade e mortalidade nestes animais. Em vista disso, para as espécies de mamíferos aquáticas e as demais de animais silvestres, Aguirre et al. (2012) ressaltaram que é

fundamental a padronização, organização e manutenção de bancos de dados e de soros sanguíneos para que se permita fazer estudos a qualquer momento da ocorrência ou prevalência de anticorpos, de forma a verificar a evolução das doenças ao longo dos anos e assim, serem elaborados os estudos de doenças infecciosas de forma ampla e temporal. A presente pesquisa demonstrou a importância da disponibilização destes dados e bancos de soros permitindo que os dados encontrados não se restringissem apenas à população existente durante o período da pesquisa, mas que tivesse uma abrangência de 26 anos de pesquisa, entre os anos de 1987 a 2013.

A seguir a discussão será dividida em tópicos com intuito de melhor sistematizar a análise dos resultados.

5.1 Pesquisa de Agentes Virais

5.1.1 Rotavírus

Os trabalhos sobre rotavirose são comuns em mamíferos terrestres, no entanto nos aquáticos não se tem muito conhecimento sobre a patogenicidade e as prevalências dos rotavírus. Em estudos com a comparação de duas populações de pinípedes na natureza na Califórnia, EUA, leões-marinhos do Gálapos (*Zalophus wolfebaeki*) e leões-marinhos da Califórnia (*Zalophus californianus*), Coria-Galindo et al. (2009) examinaram anticorpos contra rotavírus do grupo A em amostras sorológicas e realizaram testes de imunoenzaio e PCR/RT em amostras colhidas com swab retal dos mesmos indivíduos. Ambas as populações foram positivas para a presença de IgG no soro sanguíneo, mas nem todos os animais positivos neste exame foi excretado o agente nas fezes. Nas amostras de peixe-boi marinhos analisadas do Brasil foi verificada somente a eliminação do agente nas fezes, todavia pode haver uma maior prevalência do rotavírus nos peixes-bois marinhos cativos, pois no exame das amostras fecais somente foram isolados rotavírus dos animais que no momento da colheita estiveram eliminando o vírus. Ressalta-se que este é o primeiro relato da ocorrência de rotavírus em sirênios em cativeiro.

Li et al. (2011) extraíram RNA de amostra fecal de leão-marinho da Califórnia e realizaram o primeiro sequenciamento deste vírus para mamíferos aquáticos. Não existe até o momento sequenciamento do rotavírus para sirênios, sendo esta a primeira evidência de suscetibilidade da espécie ao agente. Sendo assim, tendo em vista a grande clínica e

epidemiológica do rotavírus este achado enfatiza a relevância de se realizar o sequenciamento deste agente para a espécie, necessitando-se de maiores pesquisas.

Nas espécies de animais domésticos a rotavirose é conhecida como diarreia dos bezerros por ser mais comumente encontrada nos filhotes e quando não tratada leva grande prejuízo para as criações (JEREZ et al., 2002). A maior ocorrência de isolados de rotavírus ocorreu nos peixes-bois marinhos filhotes (50%, 5/10) e jovens corroborando com Li et al. (2011).

Quanto ao sexo, apesar de ter sido encontrada uma diferença grande entre machos (70%; 7/10) e fêmeas (30%; 3/10) não se pode associar este fator a ocorrência da doença, pois não existem relatos de diferença de suscetibilidade quanto aos gêneros.

Nas amostras analisadas com relação à origem, 80% (8/10) dos peixes-bois marinhos estavam cativos no CRAS/PE, no entanto somente neste local tem a presença de filhotes e devido a suscetibilidade do vírus para animais esta faixa etária, o fato da ocorrência ser maior neste local, pode não significar que existam diferenças higiênicas sanitárias entre os tipos de cativeiro analisados e sim estar relacionada as faixa etária dos animais nestes dois ambientes. Contudo, no momento da colheita no CRAS/AL, os dois animais que foram isolados o rotavírus, estavam no mesmo recinto podendo sugerir que eles foram infectados com a mesma via de transmissão. A alta prevalência nestes dois tipos de cativeiro indicou a necessidade de adoção de medidas sanitárias e controle do agente.

5.1.2 Coronavírus

Não foi isolado nenhum coronavírus nas amostras de fezes dos peixes-bois marinhos examinadas. Considerando outras pesquisas com este agente em mamíferos aquáticos, Bossart e Schwart (1990) após verificarem anorexia e depressão em três focas que resultou em óbito destes animais, realizaram a colheita de amostras de tecido para a realização de testes de imunofluorescência, sendo isolado coronavírus canino e felino. Mihindukulasuriya et al. (2008) investigando a *causa mortis* de uma baleia-beluga (*Delphinapterus leucas*) em cativeiro na Califórnia, EUA, realizaram PCR/RT em tecido do fígado, conseguindo-se isolar e sequenciar o coronavírus para a espécie, entretanto para sirênios não se tem relato do encontro deste agente. Os trabalhos acima relataram ainda que mesmo identificando o agente *post mortem* não foi possível atribuir a *causa mortis* a este agente, no entanto todos alertaram sobre a necessidade de investigar o coronavírus na rotina clínica dos mamíferos aquáticos a

fim de identificar ainda em vida a presença do agente e possibilitar a adoção de medidas clínicas e preventivas.

5.2 Pesquisa de Agentes Bacterianos

5.2.1 Enterobactérias

As doenças bacterianas foram relatadas em inúmeras *causa mortis* em mamíferos aquáticos, no entanto, pouco se conhece sobre o seu impacto nas populações de sirênios. Esta pesquisa representou o primeiro relato da pesquisa de enterobactérias em peixes-bois marinhos nos três cativeiros (CRAS/PE, CRAS/AL e CRAS/PB) do Brasil por meio de colheitas de swabs retais, orais, genitais e nasais e abscessos.

Anteriormente a este estudo, Vergara-Parente et al. (2003) utilizaram peixes-bois marinhos cativos também no CRAS/PE e no CRAS/PB e isolaram 31 bactérias no trato respiratório dos peixes-bois marinhos em Pernambuco e 15 nos animais da Paraíba, sendo predominante *Enterobacter sakasaki*, *Bacillus* sp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Providencia rettgeri*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Bacillus* sp. No presente estudo nas amostras colhidas do swab nasal foram identificadas 13 bactérias: *Pseudomonas* sp. (28%; 14/50), *E. coli* (16%; 8/50), *Enterobacter agglomerans* (10%; 5/50), *Proteus* sp. (10%; 5/50), *Edwasiella tarda* (8%; 4/50), *Enterobacter aerogenes* sp. (6%; 3/50), *Staphylococcus* sp. (6%; 3/50), *Corynebacterium* sp. (4%; 2/50), *Proteus vulgaris* (4%; 2/50), *Arizona* sp. (2%; 1/50), *Bacillus* sp. (2%; 1/50), *Enterobacter* sp. (2%; 1/50), *Providencia* sp. (2%; 1/50).

Desde a década de 70, a pneumonia vem sendo uma preocupação nos estudos com mamíferos aquáticos apresentando sinais clínicos como tosse, dificuldades respiratórias e abscessos pulmonares principalmente em cetáceos e pinípedes sendo isolado predominantemente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* como causadoras de infecção (DUNN, BUCK e ROBECK, 2001). Na pesquisa de Vergara-Parente et al. (2003) foram colhidas amostras somente de animais sadios não tendo sido verificado sinais clínicos associados aos agentes. Na presente pesquisa verificou-se que alguns animais do CRAS/PE comumente excretavam secreção viscosa nas narinas, mas não foi possível associar esta secreção aos agentes isolados, muito embora tenha ocorrido o óbito de um

animal com piotórax tendo sido isolado neste animal as bactérias *Arizona* sp., *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Proteus* sp., *Proteus vulgaris*.

Pseudomonas aeruginosas tem sido relatada como causadora de doenças bronco respiratórias em cetáceos e pinípedes (COUCH e FOURNE, 1993). Neste estudo, 93,3% (14/15) das *Pseudomonas* sp. isoladas foram de swabs nasais e 6,7% (1/15) de swab ora), porém não foram relacionados a presença desta bactéria com doenças nos animais estudados e foi considerado como parte da microbiota natural.

Nos dugongos na Austrália em animais examinados *pós mortem* em decorrência de peritonite foram encontradas as bactérias *Aeromonas* spp., *Clostridium* spp., *Vibrio* spp., *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas* spp. não tendo sido identificado se estas bactérias foram associadas ou não à doença, pois poderiam ter crescido após o início das alterações cadavéricas (NIELSEN et al., 2013). No presente estudo, foram encontradas *Pseudomonas* spp., mas não foi verificado sinais clínicos.

Staphylococcus sp. são distribuídos mundialmente sendo encontrados principalmente na pele de animais (QUINN et al., 2005). Neste estudo foi verificada a presença desta bactéria em peixes-bois marinhos que tinham abscessos, especialmente em uma fêmea adulta de sete anos que sempre apresentou recidiva de abscessos sem causa definida a cerca de seis anos. Neste caso, todos os antimicrobianos testados foram resistentes.

As bactérias isoladas neste estudo corroboraram com os achados de Vergara-Parente et al. (2003) e estão na grande maioria associadas ao ambiente marinho ao qual estão inseridos.

5.2.1.1 *Escherichia coli*

E. coli ocorre de forma inofensiva na maioria dos hospedeiros, pois faz parte da microbiota intestinal dos animais contribuindo para as funções fisiológicas (QUINN et al., 2005; SAIDENBERG, 2008; CALIMAN, 2010). Neste estudo não foram verificados sinais clínicos relacionados às cepas de *E. coli* isoladas. Entretanto, por se tratar de uma espécie de sirênio que não se tem registros na literatura de trabalhos com a realização filogenéticas das *E. coli*, não se pode afirmar que as bactérias encontradas não possuam algum significado patológico.

Nos pinípedes da costa da Califórnia, EUA, foi isolada *E. coli* como sendo responsável por infecções gastrointestinais (PERRIN, WÜRSIG e THEWISSEN, 2001). A

identificação de *E. coli* nas amostras analisadas de peixes-bois marinhos em cativeiro no Brasil sugere uma possível contaminação da água dos recintos. Sendo assim, o controle da qualidade de água torna-se de grande relevância para a saúde dos animais, da mesma forma que a identificação das *E. coli* isoladas quanto à patogenicidade são de extrema importância para a determinação dos protocolos sanitários dos peixes-bois marinhos em cativeiro.

Vergara-Parente et al. (2003a) verificaram que as águas onde foram mantidos os peixes-bois marinhos em cativeiro apresentaram grande contaminação por *E. coli*, principalmente porque nestes locais, mesmo com o tratamento noturno com hipoclorito de sódio, os animais passaram o dia no recinto onde defecaram e urinaram, sendo esperado que se encontre a *E. coli* no ambiente. Com isso, sugere-se que as *E. coli* encontradas nos swabs de peixe-boi marinho façam parte da microbiota da espécie.

Em estudos com humanos, Duriez et al. (2001) verificaram que os grupos filogenéticos mais comuns foram os tipo A e B1, tendo sido encontrado 40% do tipo A e 34% do tipo B1 em ser humano na Croácia, França e Mali. Sabaté et al. (2008) verificaram em resíduos de água provenientes de humanos e animais, uma predominância acima de 50% da cepa do grupo A nas amostras de todas as espécies (humana, suínos aves e bovinos). O presente estudo corroborou com estes achados tendo encontrado predominantemente o grupo A com 40% (6/15) dos achados novamente alertando sobre a possibilidade de contaminação antropozoonótica e ressaltando a necessidade de verificação das possíveis vias de transmissão para o meio ambiente e as fontes de infecção para os animais.

Os grupos filogenéticos B2 e D foram relatados por Clermont, Bonacori e Bingen (2000) como os mais virulentos em estudos com humanos, neste estudo foram encontradas 20% (3/15) de cepas B2 e 20% (3/15) de cepas D podendo servir de alerta para os animais pesquisados, pois mesmo não tendo sido apresentada associação com alterações clínicas, estas bactérias podem vir a desenvolver doenças nos animais ou mesmo infectar tratadores e funcionários envolvidos na atividade.

O ser humano é reservatório natural do patótipo EPEC (TRABULSI, KELLER e TARDELLI-GOMES, 2002) e este já foi detectado em cães e gatos (KRAUSE, ZIMMERMANN e BEUTIN, 2005). Em mamíferos aquáticos não existe relato deste patótipo e o encontro deste nos peixes-bois marinhos cativos pode ser sugerido uma transmissão de caráter antropozoonótico. Estes resultados são importantes para que se protocolize a

verificação do estado sanitário com potencial patogênico nos animais cativos e naqueles que serão reintroduzidos.

As amostras que não apresentaram positividade para os patótipos testados, podem ter fator de virulência ainda não definidos, uma vez que o estudo da *E. coli* em sirênios não está ainda bem elucidado. Não obstante, por se tratarem de animais silvestres em cativeiro as cepas de *E. coli* consideradas não patogênicas para outras espécies de animais, podem ser capazes de desenvolver doenças no peixe-boi, caso ocorra um desequilíbrio da saúde ou imunidade do animal, como por exemplo, estresse devido ao manejo, qualidade da dieta, interações sociais (inter e intraespecíficas) ou pela translocação. Sendo assim, o controle das cepas de *E. coli* tanto no ambiente quanto nos animais são de extrema importância para a conservação do peixe-boi marinho.

5.2.1.2 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. ocorre em todo o mundo e em diversas espécies animais, sendo uma das mais importantes bactérias com risco zoonótico, podendo inclusive acometer mamíferos aquáticos em reabilitação e tendo como característica, possuir grande resistência aos antibióticos (SMITH, MAZET e HIRSH, 2002; CARVALHO, 2007; TRYLAND et al., 2008). Estudos realizados por Howard et al. (1983) demonstraram um grande número de mamíferos aquáticos que vieram a óbito em decorrência de septicemia por causa desta bactéria.

Vergara et al. (2001) e Vergara et al. (2003b) sugeriram que em um exemplar filhote de peixe-boi marinho cativo no CRAS/PE teve como a salmonelose como *causa mortis*. No presente estudo não foi verificada a *Salmonella* spp. nas amostras testadas, no entanto por já ter sido verificada a susceptibilidade nos estudos anteriores, a investigação periódica deste agente, assim como as medidas preventivas devem ser empregadas nos locais de manejo de peixe-boi marinho especialmente onde tenha a presença de filhotes.

Os casos de septicemia em decorrência da salmonelose em mamíferos aquáticos são comuns principalmente em animais cativos ou em animais encalhados necropsiados (DUNN, BUCK e ROBECK, 2001). Por outro lado, os mamíferos aquáticos, assim como as demais espécies, podem possuir uma forma subclínica e nos exames de cultura das fezes somente é identificada a bactéria no momento em que o animal está eliminando o agente (SMITH, MAZET e HIRSH, 2002; CARVALHO, 2007). Sendo assim o fato de não ter sido isolado o

agente durante o período não confirma que o mesmo não está presente no plantel e, por se tratarem de animais em reabilitação para posterior soltura é recomendado a adoção da pesquisa da salmonela no protocolo da rotina clínica dos peixes-bois marinhos cativos e dos exames seriados nas semanas pré-soltura.

5.2.2 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

A resistência antimicrobiana vem sendo um sério problema mundial. O uso indiscriminado de antibióticos assim como o aumento de “super bactérias” multirresistentes tem aumentado a necessidade de busca de novos fármacos, mas também tem reforçado a necessidade de se controlar o uso dos medicamentos com a realização de testes de sensibilidade que direcionem o tratamento (SHINOHARA e NOBRE, 2004; WALKER, 2010; CALIMAN, 2010; DEBABOV, 2013). Os protocolos de conduta terapêutica para peixes-bois são baseados principalmente nas informações de Dierauf e Gulland (2001) e de D’Fonseca-Neto e Vergara-Parente (2007), mas estes compilados em livros didáticos não preenchem todas as informações sobre a farmacologia de sirênios. As amostras analisadas demonstraram grande resistência aos antibióticos testados, este fato pode ter ocorrido em virtude do uso contínuo e restrito destes medicamentos com protocolos não estabelecidos para a espécie, uma vez que as dosagens e tempo de tratamento, quando não inclusos nos estudos mencionados, são geralmente baseados na experiência clínica de outras espécies. Com isso a realização de testes de sensibilidade na rotina clínica da espécie deve ser empregada no manejo clínico dos animais.

Os estudos de sensibilidade microbiana realizados em mamíferos marinhos (SMITH, MAZET e HIRSH, 2002; REYNOLD et al., 2005; TRYLAND et al., 2008; SHAEFER et al., 2009) vem demonstrando grande resistência aos antibióticos corroborando estes resultados com os encontrados nesta pesquisa com os peixes-bois marinhos do Brasil, onde 67,4% (426/632) das análises apresentaram resistência aos antibióticos testados.

Stoddard et al. (2008b) encontraram em leões-marinhos uma resistência maior nos animais que passaram por cativeiro do que naqueles que não tiveram contato com esta condição, sendo que a ampicilina e tetraciclina foram os antibióticos que apresentaram maior resistência. Nos peixes-bois marinhos não foram realizadas comparações entre os animais que passaram por cativeiro e os animais nativos, entretanto a ampicilina também apresentou grande resistência.

O conhecimento farmacológico em sirênios requer longos estudos não tendo sido realizado nesta pesquisa, pois não se constituiu de um objetivo. Por outro lado, o CMA/ICMBio atualmente é a única instituição que mantém esta espécie em cativeiro e o número de animais disponíveis para estudos são poucos, sendo este estudo o mais amplo realizado com a espécie no Brasil. Neste sentido, este trabalho atenta para a necessidade de se manter sempre atualizada com o máximo de informações possíveis o banco de dados, relatórios, fichas clínicas e protocolos de exames laboratoriais nos animais cativos pois, esta exclusividade de manutenção de peixe-boi marinho, tende a mudar nos próximos anos e, este estudo poderá subsidiar as novas instituições com as tomadas de decisões clínicas com base nos fármacos já utilizados.

5.3 Exames sorológicos

A baixa ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp., anti-*B. abortus* e anti-*T. gondii* nos peixes-bois marinhos em cativeiro do Brasil foi também semelhante em peixes-bois marinhos de vida livre em Belize e México (SULZNER et al., 2012).

As infecções e as doenças causadas por estes agentes estão entre as que mais preocupam a saúde pública e todas as três foram objeto de estudo desta pesquisa. A brucelose além de acarretar grande impacto na saúde pública, atinge a economia nacional quando afetando espécies de animais de produção (GREVE et al., 2007; NYMO, TRYLAND e GODFROID, 2011). A toxoplasmose pode ser transmitida ao homem tanto com a ingestão de carne mal cozida quanto por alimento contaminados (DUBEY, 2010) e a leptospirose, como já dito é uma doença cosmopolita que afeta a maioria dos mamíferos podendo ser carregada pela água e alimentos contaminados (CORRÊA, 2007).

Nos peixes-bois marinhos analisados foram identificados animais soropositivos para os três agentes etiológicos, contudo, não foi possível identificar as vias de transmissão e as fontes de infecção.

5.3.1 Pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp.

Este foi o primeiro relato da ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em peixes-bois marinhos em cativeiro do Brasil e sendo encontrados em cinco (9,2%) dos 54 animais soropositivos. Os sorovares mais prevalentes foram: Australis, Autumnalis, Bataviae,

Brastislava e Icterohaemorrhagiae. Dentre os cinco animais soropositivos, três eram machos, dois eram fêmeas e todos eram adultos. De acordo com a origem, dois animais soropositivos eram do CRAS/PE e três eram do CRAS/AL. Dos três “animais em adaptação” soropositivos do CRAS/AL, em um deles sugere-se que houve exposição ao agente etiológico (*Leptospira* spp.) no CRAS/AL porque no CRAS/PE e no momento da sua chegada no CRAS/AL ele não era soropositivo. No segundo indivíduo pode-se afirmar que a infecção ocorreu no CRAS/PE, pois ele não saiu deste local e no terceiro indivíduo não podemos sugerir onde houve a exposição ao agente.

Em outras espécies de mamíferos aquáticos anticorpos anti-*Leptospira* spp. foram descritos nos pinípedes leões-marinhos da Califórnia, focas e elefantes-marinhos (*Mirounga angustirostris*) na Califórnia/EUA (COLAGROSS-SCHOUTEN et al., 2002; CAMERON et al., 2008) e em peixes-bois amazônicos (*Trichechus inunguis*) no Brasil (MARVULO et al., 2003; MATHEWS et al., 2010). Os leões-marinhos da Califórnia apresentam a cada 3-4 anos conhecidamente na Costa Oeste Americana uma surto de leptospirose levando grande número de animais a encalharem na região da Califórnia à Columbia Britânica. Em 2004, cerca de 300 indivíduos foram encontrados nesta região e foram amostrados 33 amostras de soros e, 90,9% (30/33) destes foram soropositivos (CAMERON et al., 2003). Na pesquisa de Mathews et al. (2010) foi encontrada uma soropositividade de 31,1% (23/74) para peixes-bois amazônicos para anticorpos anti-*L. interrogans*. No presente estudo, a ocorrência de anticorpos de 9,2% (5/54) foi abaixo das encontradas em outras espécies, no entanto demonstrou a necessidade de controle do agente a fim de evitar que surtos semelhantes ao relatado ocorram com o peixe-boi marinho no Brasil, uma vez que dentre as espécies citadas, este é o mais ameaçado de extinção.

Em leões-marinhos da Califórnia foi registrado um surto de leptospirose principalmente pela *L. interrogans* sorovar Pomona, causando abortos e doença renal (McILHATTAN et al., 1971). Nos peixes-bois marinhos cativos do Brasil não foram identificados sinais clínicos relacionados à leptospirose.

Silva et al. (2001) realizaram exame sorológico para leptospirose em 12 peixes-bois marinhos cativos no Brasil no CRAS/PE, mas todos animais foram soronegativos. Este resultado é importante, pois oito anos após este primeiro inquérito sorológico foi verificado animais soropositivos no presente estudo. Desta forma, as mudanças de manejo, assim como, as ambientais neste período devem ser analisadas no CRAS/PE a fim de restabelecer um

protocolo de controle da leptospirose na instituição. Estes achados foram identificados nas amostras de soros sanguíneos colhidas entre os anos de 2009 e 2013 sugerindo que neste período o risco de exposição ao agente foi maior do que nos anos anteriores. Os animais do CRAS/PE foram mais expostos do que os demais possivelmente por passarem maior tempo neste local e em função do sistema fechado de tratamento de água enquanto nos cativeiros de ambiente natural em Alagoas e na Paraíba, o fluxo de água é constante. Uma mudança do perfil da soropositividade de anticorpos anti-*Leptospira* spp. também foi verificada por Burek et al. (2003) que realizaram estudos com leões-marinhos (*Eumetopias jubatus*) no Alasca com dados com 10 anos de diferença entre as colheitas das amostras. Verificou-se que após este período, 2% (3/137) dos animais foram soropositivos.

Não foi possível na presente pesquisa identificar as vias de transmissão e nas demais pesquisas com mamíferos aquáticos não foram elaborados ciclos de transmissão deste agente. Até o momento os protocolos estabelecidos para peixes-bois marinhos foram baseados em estudo sobre a epidemiologia da *Leptospira* spp. em outras espécies animais (GREENE, 2004; GROVES, HARRINGTON e TABOADA, 2004; CORREA, 2007). Sendo assim, nesta pesquisa foi proposto um ciclo epidemiológico com as possíveis vias de transmissão do agente para o peixe-boi marinho (Figura 26).

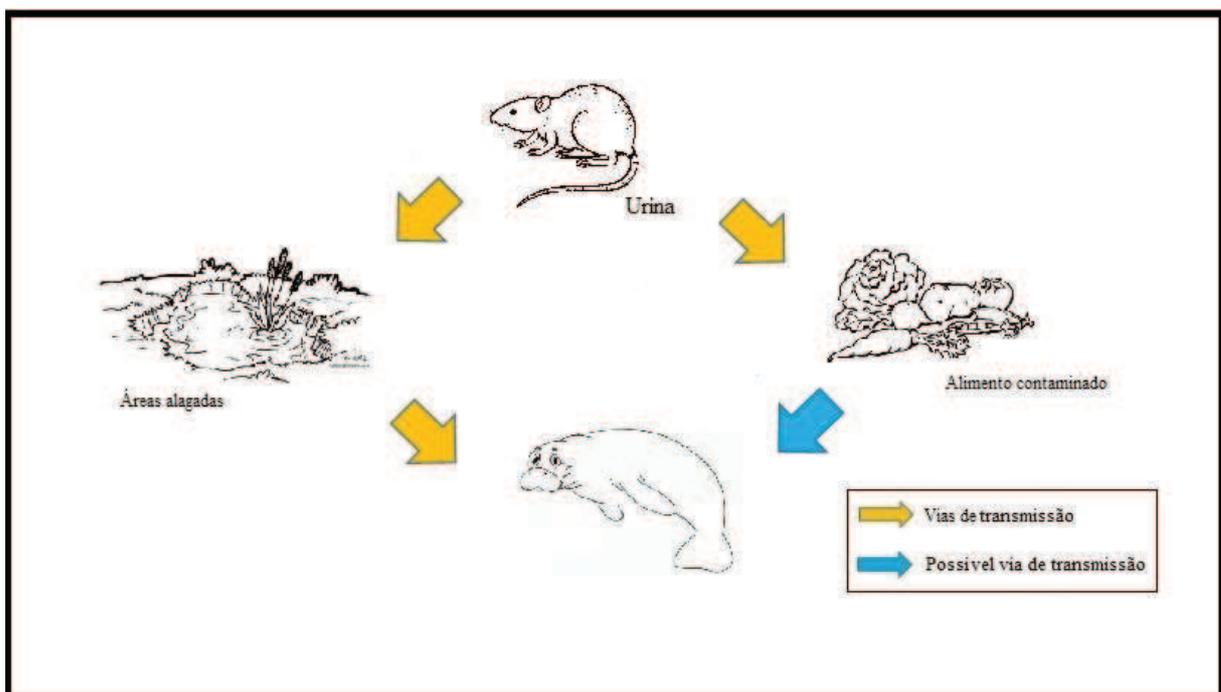


Figura 26. Ciclo de transmissão de leptospirose em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*).

Neste ciclo, sugeriu-se que roedores possam estar excretando as leptospiros por meio da urina, contaminando a água fornecida aos animais ou as áreas alagadiças como as de manguezais presentes nos ambientes estudados, e em contato com a água contaminada os animais são infectados. Uma outra via sugerida é que a urina dos roedores estejam contaminando os alimentos fornecidos aos animais, tais como verduras, legumes, frutas e algas e, supostamente estes possam estar servindo como porta de entrada com a ingestão de alimentos contaminados. Para os peixes-boi, entretanto não se tem relato da eliminação do agente pela urina, e por isso não podem por enquanto serem considerados também como fonte de infecção.

5.3.2 Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* spp.

Este foi o primeiro relato da ocorrência de anticorpos anti-*B. abortus* em peixes-bois marinhos em cativeiro do Brasil em cinco (9,3%) dos 54 animais analisados. Contudo, mesmo com estes resultados positivos no exame sorológico do Teste do Antígeno Acidificado (Rosa Bengala), estes soros necessitam serem confirmados com o Teste de Fixação de Complemento. Dentre os cinco animais soropositivos, quatro eram fêmeas e um macho, todos adultos, sendo dois oriundos do CRAS/PE e dois do CRAS/PB. As três fêmeas soropositivas permaneciam num mesmo oceanário com a presença de outros animais soronegativos. Os filhotes destas três fêmeas também foram soronegativos. Desta forma, após a confirmação dos resultados com o Teste de Fixação de Complemento novas pesquisas serão necessárias para um melhor entendimento da cadeia epidemiológica da brucelose em peixes-bois marinhos.

Em estudos realizados com sirênios no restante do mundo, não foi até o momento identificada a presença de *Brucella* spp. e nem de animais soropositivos (HERMANEZ-MORA, PALACIOS-ALFARO, e GONZÁLEZ-BARRIENTOS, 2013; SULZNER et al., 2012).

A via de transmissão da brucelose entre mamíferos aquáticos também ainda não está bem estabelecida (HERMANEZ-MORA, PALACIOS-ALFARO, 2013; GONZÁLEZ-BARRIENTOS, 2013) e por esta razão não se pode afirmar se estes animais eliminam o agente, entretanto por se tratarem de animais em idade reprodutiva, a gestação destas fêmeas, se houver, deve ser monitorada.

5.3.3 Pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

A presença de anticorpos anti-*T. gondii* foi determinada em 6 (10,9%) dos 55 peixes-boi marinhos examinados, sendo três machos e três fêmeas, dois jovens e quatro adultos, e com relação a soropositividade foi: CRAS/AL (16,7%; 2/12), CRAS/PE (10,5%; 4/38) e CRAS/PB (0%, 0/5). Duas fêmeas do CRAS/PE em idade reprodutivas foram soropositivas, no entanto os seus filhotes foram soronegativos, supostamente não ocorrendo a transmissão transplacentária ou horizontal. Caso estas fêmeas venham novamente a reproduzir, sugere-se que seja realizado o monitoramento do filhote durante toda a gestação e a colheita do soro sanguíneo de ambos para monitoramento sorológico.

De acordo com a origem dos seis animais soropositivos, em quatro deles pode ser afirmado que eles foram infectados no CRAS/PE, pois estes somente permanecerem neste local. Os outros dois animais foram translocados para o CRAS/AL com a realização do exame sorológico no CRAS/PE, porém os animais passaram no mínimo um mês neste cativeiro antes da translocação e o animal foi novamente testado somente no CRAS/AL. Como a infecção ocorreu neste intervalo, não podemos afirmar em qual dos dois locais houve a infecção por *T. gondii* nos animais. Em 2001, Silva et al. pesquisaram anticorpos deste agente em 11 peixes-bois marinhos do CRAS/PE e a única fêmea soropositiva continua até hoje com este mesmo status sorológico e apresentou um título incomum de 25600. Esta é a maior titulação de anticorpos anti-*T. gondii* já registrada para mamífero aquático em todo o mundo. Mesmo tendo ocorrido uma baixa prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* entre a população estudada, foi verificado que o número de animais infectados cresceu de um para cinco animais desde o primeiro estudo em 2001. Sendo assim, verifica-se que nas instituições existem fatores predisponentes para a transmissão deste agente. Diante disto, torna-se importante determinar a situação epidemiológica da toxoplasmose em sirênios em cativeiro e de vida livre no Brasil.

Os estudos sorológicos da infecção por *T. gondii* em mamíferos aquáticos são raros, entretanto vem crescendo nos últimos anos. Em outros estudos realizados com peixes-bois marinhos, em Porto Rico no período de 2003 a 2005, um animal foi soropositivo dentre os 27 examinados e em três animais necropsiados foram evidenciados taquizoítos de *T. gondii* pela imunoistoquímica (BOSSARD et al., 2012) e no Peru, Delgado et al. (2013) encontraram 63,2% (12/19) de soropositivos. Em nosso país, Mathews et al. (2012) verificou a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em peixes-bois amazônicos em 39,2% (29/74) dos animais de

duas instituições brasileiras (INPA e CPPMA). A ocorrência de anticorpos nestas duas instituições foi respectivamente de 58,9% (23/39) e 17,1% (6/35).

Em nenhum peixe-boi marinho do Brasil que veio à óbito durante a pesquisa foi realizada a tentativa de isolamento do *T. gondii*, mas todos os animais que morreram durante o estudo tiveram em algum momento o soro analisado e nenhum deles foi soropositivo. Todavia, a caracterização da presença do agente como subclínica e sabendo-se da presença do agente entre a população cativa, recomenda-se que todas as necropsias que venham a acontecer sejam realizadas colheitas de material biológico para o isolamento deste agente pela prova biológica e a caracterização molecular, além de exames de imunistoquímica.

Da mesma forma que na leptospirose e na brucelose, não foi possível identificar as vias de transmissão da toxoplasmose, apesar de possuir gatos domésticos e possivelmente felídeos silvestres das espécies jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*) próximos dos recintos dos peixes-bois marinhos nos CRAS/PE, CRAS/AL e CRAS/PB. Também nas demais pesquisas realizadas com mamíferos aquáticos, não foram elaborados ciclos de transmissão do *T. gondii*. Diante desta lacuna, sugeriu-se o ciclo deste agente para os peixes-bois marinhos (Figura 27). Para a confecção deste ciclo foram utilizadas as informações do ciclo conhecido para outras espécies (SILVA, 2007; DUBEY, 2010). No ciclo que se propõe para os animais deste estudo, os hospedeiros definitivos do *T. gondii* os gatos ou outros pequenos felídeos silvestres podem ingerir carne ou presas com bradizoítos em cistos teciduais e eliminarem oocistos de *T. gondii* pelas fezes, podendo contaminar o meio ambiente, a água e o alimento fornecidos aos peixes-bois marinhos cativos. Estes, por sua vez não eliminam o parasito por serem hospedeiros intermediários e provavelmente não infectarão outros hospedeiros, pois isso ocorreria somente no caso do consumo da carne do peixe-boi marinho por humanos ou outros animais carnívoros. Não foi descrito ainda a via de transmissão transplacentária para os peixes-bois marinhos, mas acredita-se que ela possa ocorrer.

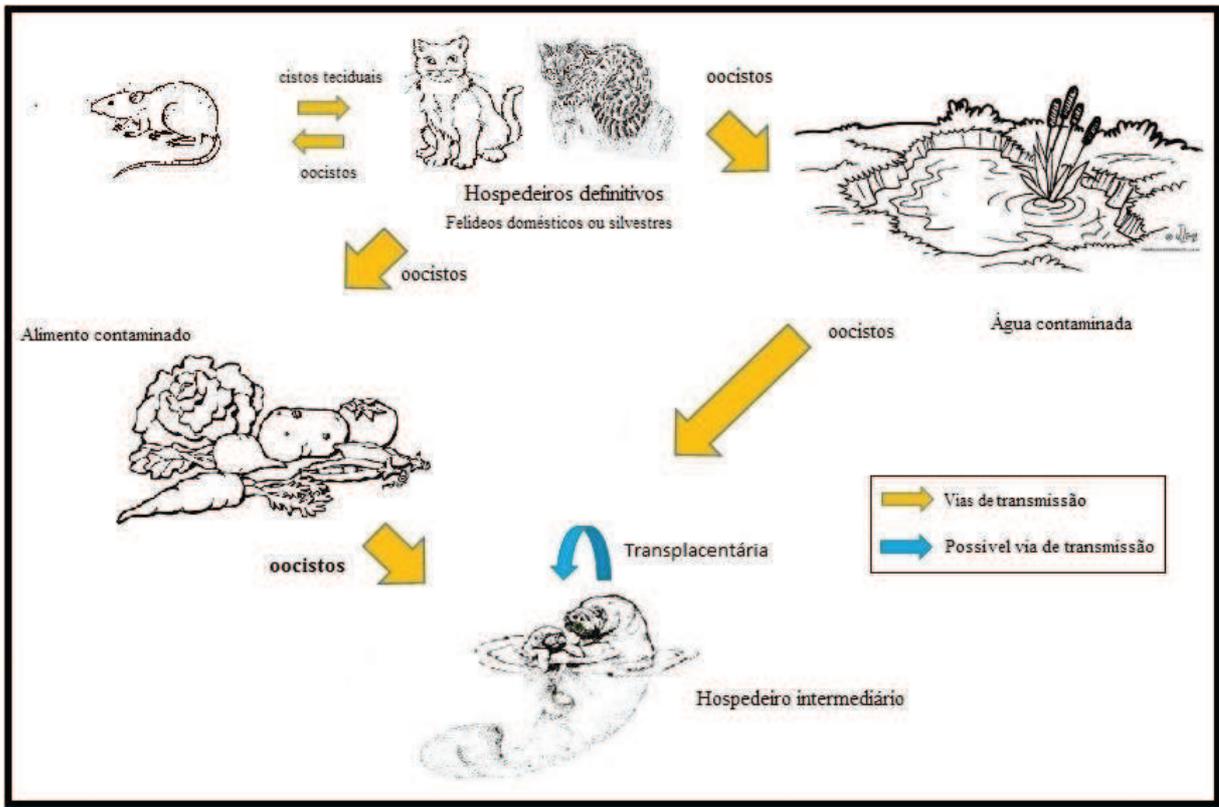


Figura 27: Ciclo de transmissão de toxoplasmose em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*).

Os mamíferos marinhos foram descritos por Bossard (2011) como sentinelas do ambiente, porque estes animais percorrem diversas regiões e a avaliação clínica deles pode trazer informações sobre as condições sanitárias dos locais de ocorrência das espécies examinadas. Como exemplo, o autor citou os casos de toxoplasmose em lontras-marinhas na Califórnia, pois estes animais se alimentavam do mesmo pescado do consumo dos humanos, sendo possível assim investigar os processos que promoveram a infecção nos humanos, animais domésticos e silvestres, inclusive em peixes-bois da Flórida.

Alba et al. (2013) pesquisaram um indivíduo de golfinho-listrado (*Stenella coeruleoalba*) com meningoencefalite no mar Mediterrâneo e verificou uma co-infecção de *B. cetti* com *T. gondii* em exames histopatológicos de tecido do cérebro. O animal pode ter tido a co-infecção devido a uma queda imunológica e com isso ter ocorrido uma maior gravidade do quadro clínico. Nos peixes-bois avaliados no Brasil, duas fêmeas apresentaram a presença do anticorpos anti-*B. abortus* e anti-*T. gondii*. Desta forma, necessita-se de maiores estudos sobre esta co-infecção e uma possível ocorrência de quadros de meningoencefalite, que podem

ocorrer por uma queda imunológica em situação de estresse, em sirênios que podem estar associados a estes dois agentes etiológicos.

5.4 Análise de Sobrevida

A manutenção em cativeiro de espécies de animais silvestres ameaçadas de extinção com vistas a garantir sua existência futura tem sido descrita como uma importante ferramenta na conservação destas espécies (BILSKI, 2011; BOWKETT, 2009). Os dados da presente pesquisa corroboraram com esta informação, pois demonstraram que com as atividades realizadas pelo CMA/ICMBio a maioria dos peixes-bois marinhos em reabilitação sobreviveram ao período crítico de risco de vida e puderam num tempo inferior a oito anos serem novamente devolvidos ao ambiente natural.

De acordo com a função de sobrevida relacionada com a permanência dos animais, foi verificado que após oito anos em cativeiro, os peixes-bois marinhos em reabilitação não vêm sendo reintroduzidos, independente do sexo. Conforme descrito por Lima, Alvite e Vergara (2007) os peixes-bois marinhos para serem reintroduzidos foram divididos em três categorias na avaliação dos aspectos comportamentais, clínicos e genéticos. Quanto à idade, foram divididos em: 1) aptos à reintrodução com dois a cinco anos, 2) aptos com restrições com cinco a 10 anos e 3) Não aptos acima de 10 anos. Em conformidade com estas categorias, todos os animais reintroduzidos estiveram todos dentro das duas primeiras categorias. Entretanto, na presente pesquisa não foi objetivou-se avaliar o comportamento dos animais, apenas analisar os dados dos animais que já foram reintroduzidos.

Na função de sobrevida relacionada a mortalidade dos indivíduos foi verificado que os riscos de óbito dos animais estiveram relacionados com a idade, sendo que no primeiro ano ocorreu o maior risco, diminuindo com o desenvolvimento dos animais e se estabilizando aos quatro anos de idade. Estes dados são semelhantes com os estudos de taxa de mortalidade da maioria dos mamíferos marinhos conforme descrito por Stolen e Barlow (2003) e sobre a biologia da espécie, que no primeiro ano de vida o filhote foi extremamente dependente da mãe e permaneceu sob os cuidados parentais até o segundo ano (REEP e BONDE, 2006). Os gráficos de sobrevida confirmaram estes dados confirmando que o período de maior risco foram os primeiros anos de vida, verificando-se a dependência dos filhotes com os cuidados

maternos, fornecidos “artificialmente” por técnicos e tratadores durante o processo de reabilitação.

A tábua da vida correlacionada com os achados laboratoriais desta pesquisa demonstrou que o declínio populacional pode não estar associado à doenças infecciosas e sim a fatores naturais reforçando a questão da dependência materna nos primeiros anos de vida. Neste sentido, os animais mais dependentes e frágeis são mais susceptíveis a fatores externos que o levem ao óbito, entre eles queda imunológica devido ao estresse.

Os dados sugeriram que as atividades de resgate e reabilitação realizadas pelas três instituições envolvidas têm sido positivas na conservação da espécie de peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*), uma vez que 40,4% (36/89) dos animais que chegaram vivos ao CMA/ICMBio foram reintroduzidos. Mesmo que após este momento tenham vindo à óbito, as razões que o levaram a este status não foram relacionadas à doenças adquiridas em cativeiro, permitindo que estes animais chegassem sadios ao ambiente natural. Entretanto, uma prevalência de 28,1% (25/89) de animais que vieram à óbito num mesmo recinto (CRAS/PE) indicaram a necessidade de adoção de medidas preventivas e readequação de protocolo de manejo e de biossegurança para minimizar esta mortalidade.

6 CONCLUSÕES

Diante do exposto, esta pesquisa apresentou a primeira descrição da presença de rotavírus, da soroprevalência de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* e anti-*Toxoplasma gondii*, da diferenciação das *E. coli* e da análise de sobrevivência para peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) em cativeiro no Brasil. Além disso, esta é primeira pesquisa sobre Medicina da Conservação com enfoque nas condições de saúde dos peixes-bois marinhos mantidos em cativeiros no Brasil.

Desta forma, torna-se necessário a continuidade da realização de estudos epidemiológicos de patógenos e doenças para a espécie visando verificar o *status* da saúde destes animais e procurando identificar as possíveis fontes de infecção e os fatores de risco destes achados. No entanto, igualmente importante se tornam-se estes estudos nas populações nativas, para se fazer um levantamento e a comparação dos agentes e assim determinar o mapa de riscos epidemiológicos para a espécie.

As doenças selecionadas não foram verificadas apresentando apenas quadros subclínicos e apesar de ter sido verificada uma baixa prevalência destes agentes, recomenda-se a adoção de um Protocolo Operacional Padrão (POP) com medidas de biossegurança e verificação da saúde dos animais cativos, assim como um rigoroso estudo sobre as condições ambientais dos locais onde estão inseridos os três diferentes cativeiros (CRAS-PE, CRAS-AL e CRAS-PB) (Apêndice D).

Uma vez realizado o estudo inicial dos patógenos circulantes e verificado que estes possuem grande potencialidade zoonótica, propõe-se que sejam realizados estudos epidemiológicos rotineiros tanto da população de animais cativos, quanto dos funcionários da instituição.

A verificação da tendência de óbito de animais até os quatro anos e posterior estabilização do mesmo demonstra a importância do rigor no acompanhamento clínico dos animais nesta fase inicial.

A translocação da grande maioria dos animais reabilitados, permitindo uma maior soltura destes animais, mostrou que cativeiro vem cumprindo o papel de conservação para a espécie *Trichechus manatus* permitindo um retorno ao ambiente natural dos animais reabilitados e mantendo a saúde dos animais após um período de estabilização. Sendo assim é

recomendado a utilização desta ferramenta para garantir a existência de indivíduos nas gerações futuras.

Com os resultados apresentados foi proposto uma escala de risco de transmissão de patógenos onde as doenças verificadas se caracterizaram como relevantes para a saúde pública. Principalmente a identificação da *Leptospira* spp entre os animais pesquisados.

De uma maneira geral os peixes-bois marinhos em cativeiro no Brasil encontravam-se saudáveis e em boas condições físicas, além de não parecerem estar ameaçados com a presença dos patógenos selecionados. O sucesso na saída dos animais para a translocação em ambiente natural verificados na sobrevivência destes indivíduos, ressalta esta boa condição. Porém este trata-se apenas do ponto inicial para o estudo da epidemiologia de ocorrência de agentes patogênicos e da sua soroprevalência em sirênios. Com isso, outras pesquisas serão necessárias para o conhecimento da espécie no que se refere às outras questões relacionadas a saúde ecológica.

7 REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: OPAS, 2001. 480 p.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.

AGUIRRE, A. A.; ROSTAL, M. K.; ZIMMERMAN, B.; KEEFE, T. J. Epidemiologic investigation of pathogens in marine mammals. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; DASZAK, P. **New directions in conservation medicine. Applied cases of ecological health**. 1a. ed. New York: Oxford University Press, 2012. Cap. 39, p. 563-575.

ALBA, P.; TERRACCIANO, G.; FRANCO, A, LORENZETTI S.; COCUMELLI, C.; FICHI, G.; ELENI, C.; ZYGMUNT, M. S.; AXEL CLOECKAERT, BATTISTI, A. The presence of *Brucella ceti* ST26 in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) with meningoencephalitis from the Mediterranean Sea. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 1-2, p. 158–163, 2013.

ALFIERI, A.; ALFIERI, A.; BEUTTEMULLER, E.A.; BRITO, B.G.E.; MEDICI, K.C. Aspectos epidemiológicos da rotavirose suína na região sudoeste do estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 20, n. 1, p. 5-11, 1999.

ALFIERI, A.; ALFIERI, A.; TAKICHI, E.; LOBATO, Z.I.P. Reoviridae. In: FLORES, E.F. (ORG). **Virologia veterinária**. 1 ed. Santa Maria: UFSM, 2007. Cap. 30, p. 809-838.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; EPIETZ, D. E. **Las técnicas de laboratorio em la brucelosis**. 2a. ed. Genebra: Organización Mundial de la Salude, 1976. 175 p.

ANDRIOLO, A. Desafios da conservação da fauna. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: Medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 3, p. 19-25.

BAUER G. B.; COLBERT, D. E.; GASPARD III, J. C.; LITTLEFIELD B.; FELLNER, W. Underwater visual acuity of Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). **International Journal of Comparative Psychology**, v. 16, n. 2-3, p. 130-142, 2003.

BAUER G. B.; COLBERT, D. E.; GASPARD III; DZIUK, K.; CARDWELL, A.; REEP, R. L.; MANN, D. Sensory process and cognition in Florida Manatee, *Trichechus manatus latirostris*. In: Florida Marine Mammal Health Conference, III, 2008, St Augustine. **Anais...** St Augustine, 2008. p. 6.

BATISTA, C. S. A.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J. VASCONCELOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; CLEMENTINO, I. J.; LIMA, F. S. NETO, J.O.A. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 2, p. 131-136, 2004.

BECK, C. A.; BARROS, N. B. The impact of debris on the Florida manatee. **Marine Pollution Bulletin**, v. 22, n. 10, p. 508-510, 1991.

BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. 1 ed. São Paulo: Roca, 1998, 394 p.

BEST, R. C. The aquatic mammals and reptiles of the Amazon. In: SIOLI, H. **The Amazon limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin**. 1 ed. Springer: Netherlands, 1984. Cap. 15, p. 371-412.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BILSKI, D. R. **Genética da conservação da população cativa do cachorro-vinagre, *Speothos venaticus* (CARNIVORA:CANIDAE)**. 2011. 50 f. Dissertação (mestrado). Ecologia e conservação. Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2011.

BOGOMOLNI, A. L.; GAST R. J.; ELLIS, E. C.; DENNETT, M.; PUGLIARES, K. R. LENTELL, B. J.; MOORE, M. J. Victims or vectors: a survey of vertebrate zoonosis from coast waters of the Northwest Atlantic. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 81, n. 19, p. 13-38, 2008.

BORGES, J. C. G.; ALVES; FAUSTINO, M. A. G. Criptosporidiose: uma revisão sobre a sua implicação na conservação dos mamíferos aquáticos. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 91-96, 2007.

BORGES, J. C. G.; ALVES; FAUSTINO, M. A. G.; LIMA, A. M. A. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) e funcionários envolvidos no manejo da espécie. **Estudos de Biologia**, v. 66, p. 33-41, 2007.

BORGES, J. C. G.; VERGARA-PARENTE, J. E.; ALVITE, C. M. C. Embarcações motorizadas: uma ameaça aos peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) no Brasil. **Biota Neotropical**, v. 7, n. 3, p. 199-204, 2007.

BORGES, J. C. G.; ALVES; VERGARA-PARENTE, J.E.; FAUSTINO, M. A. G.; MACHADO, E.C.L. Ocorrência de infecção *Cryptosporidium* spp. em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 60-61, 2009.

BOSSART, G. D; SHAWARTZ, J. C. Acute necrotizing enteritis associated with suspected coronavirus infection in three harbor seal (*Phoca vitulina*). **Journal of Wildlife Medicine**, v. 21, n.1, p. 84-87, 1990.

BOSSART, G. D; REIDARSON, T. H.; DIERAUF, L. A.; DUFFIELD, D. A. Clinical Pathology. In: DIERAUF, L. A; GULLAND, F. M. D. **CRC handbook of marine mammal medicine**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2001a. Cap. 19, p. 383-430.

BOSSART, G. D. Manatee. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. **CRC handbook of marine mammal medicine**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2001b. Cap. 43, p. 939-960.

BOSSART, G. D.; EWING, R.; LOWE, M.; SWEAT, M.; DECKER, S.; WALSH, C.; GHIM, S.; JENSON, A.B. Viral papillomatosis in Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, n. 1, p. 37-48, 2002.

BOSSART, G. D. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. **Oceanography**, v. 19, n. 2, p. 134-137, 2006.

BOSSART, G. D. Emerging diseases in marine mammals: from dolphins to manatees. Exposures to viruses, pollutants may lead to diseases, sometimes involving immune dysfunctions, among marine mammals. **Microbe-American Society for Microbiology**, v. 2, n. 11, p. 544-549, 2007.

BOSSART, G. D. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 3, p. 676-690, 2011.

BOSSART, G. D.; MIGNUCCI-GIANNONI, A. A.; RIVERA-GUZMAN, A. L.; JIMENEZ-MARRERO, N. M.; CAMUS, A. C.; BONDE, R. K.; DUBEY, J. P.; REIFS, J. S. Disseminated toxoplasmosis in Antillean manatees *Trichechus manatus manatus* from Puerto Rico. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 101, n. 2, p. 139-144, 2012.

BOWKETT, A. E. Recent captive-breeding proposals and the return of the ark concept to global species conservation. **Conservation Biology**, v. 23, n. 2, p. 773-776, 2009.

BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; VILLARREAL, L. Y. B.; RODRIGUEZ, C. A. R.; SOARES, R. M; JEREZ, J. A. A nested polymerase chain reaction to bovine coronavirus diagnosis. **Virus Reviews & Research**, v. 10, n. 1, p. 45-49, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. **Centro Nacional de Epidemiologia**. Brasília: DF; 1995. 98 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT): Manual Técnico**. Brasília: DF, 2006. 188p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNECBT**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/sanidade-animal>>. Acesso em 30 Jan. 2013.

BROOKS, G. K.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N. J. **Melnick & Adelberg's medical microbiology**. 23. ed. Philadelphia: Mcgraw-Hill Medicine, 2004, 704 p.

BUCHANAN, R. E.; GIBBON, E. N.; BERGEY, D. H. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8 ed. Georgia: Ed. University of Georgia, 1975. 1268 p.

BUERGEL, C. D.; BONDE, R. K. *Toxoplasmic meningencephalitis* in a West Indian manatee. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 183, n. 11, p. 1294-1296, 1983.

BUREK, K. A.; GULLAND, F. M. D.; SHEFFIELD, G.; KEYES, E; SPRAKER, T. R.; SMITH, A. W.; SKILLING, D. E.; EVERMANN, J.; STOTT; J.L.; TRITES, A. W. Disease agents in Steller sea lions in Alaska: a review and analysis of serology data from 1975-2000. **Fisheries Centre Research Reports**, v. 11 n. 4, p. 26, 2003.

CABEZÓN, O.; RESENDES, A. R.; DOMINGO, M.; RAGA, J. A.; AGUSTI, C.; ALEGRE, F.; MONS, J. L.; DUBEY, J. P.; ALMERÍA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild dolphins from the Spanish Mediterranean Coast. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 643-644, 2004.

CALIMAN, M.C.W. **Estudos de vigilância bacteriológica: isolamento, fatores de virulência e resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de gatos domésticos na região de Ribeirão Preto**. 2010. 96 f. Dissertação (mestrado).

Microbiologia agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, São Paulo, 2010.

CANDEIAS, J. A. N. Diarreias virais. In: TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. de. **Microbiologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1998. Cap. 66, p. 359-367.

CATAO-DIAS, J. L. Doenças e seus impactos sobre a biodiversidade. **Ciência e Cultura**. v. 55, n. 3, p. 32-34, 2003.

CATAO-DIAS, J. L. Biossegurança na manipulação de animais silvestres. Biossegurança na reintrodução de animais silvestres na natureza. **Ciências Veterinárias Tropical**, v. 11, n. 1, p.178-181, 2008.

CARVALHO, V. M. Colibacilose e salmonelose. In: In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: Medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 45, p. 742-750.

CEBULA T. A.; PAYNE W. L.; FENG, P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay–multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 248-250, 1995.

CHIARELLO, A. G.; AGUIAR, L. D. S.; CERQUEIRA, R.; MELO, F. R.; RODRIGUES, F. H. G.; SILVA, V. M. Mamíferos Ameaçados de Extinção no Brasil. In: A. B. M. Machado, G. M. DRUMMOND and A. P. Paglia (eds.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: Fundação Biodiversidade, p. 681-874, 2008.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4555–4558. 2000.

COLAGROSS-SCHOUTEN, A. M.; MAZET, J. A.; GULLAND, F. M.; MILLER, M. A.; HIETALA, S. Diagnosis and seroprevalence of leptospirosis in California sea lions from coastal California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 1, p. 7–17, 2002.

COLE, J. R.; SULZER, C. R.; PURSELL, A. R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 976-980, 1973.

COLOSIMO, E. A.; GIOLO, S. R. **Análise de sobrevivência aplicada**. 1 ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2006. 370 p.

CORRÊA, S. H. R. Leptospirose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: Medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 44, p. 736-741.

COUCH, J. A.; FOURNIE, J. W. (eds.). **Pathobiology of marine and estuarine organisms**. v. 2. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, 1993. 564 p.

COWAN, D. F.; HOUSE, C.; HOUSE, J. A. Public Health. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. **CRC handbook of marine mammal medicine**. 2 ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001. Cap. 34, p. 767-778.

CROUSE, D. T.; CROWDER, L. B.; CASWELL H. A stage-based population model for loggerhead sea turtles and implications for conservation. **Ecology**, v. 68, n. 5, p. 1412–1423, 1987.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: Medicina veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2007. 1354 p.

D’AFFONSECA NETO, J. A.; VERGARA-PARENTE, J. E. Sirenia (Peixe-boi Marinho e Amazônico). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: Medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 41, p 701-714.

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

DEBABOV, D. Antibiotic Resistance: Origins, mechanisms, approaches to counter. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 8, p.665-671, 2013.

DELGADO, P. M.; PEREA, N. S.; DELGADO, J.P.M.; GARCIA, C.B.; MALHEIROS, A. F.; DAVILA, C.R.G. Detection of infection with *Toxoplasma gondii* in manatees (*Trichechus inunguis*) of the Peruvian amazon. Detección de infección por *Toxoplasma gondii* en manatíes (*Trichechus inunguis*) de la Amazonía peruana. **Acta Biológica Colombiana**, v. 18, n. 1, p. 211-216, 2013.

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

DIERAUF, L. A; GULLAND, F. M. D. **CRC handbook of marine mammal medicine**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. 1063 p

DONAVAN, T.M.; WELDON, C.W. **Spreadsheet exercises in ecology and evolution**. 1 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. 556 p.

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

DUBEY, J. P.; GREENE, C. E.; LAPPIN, M. R. Toxoplasmosis and neosporosis. In GREENE, C. E. (ed). **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 493-509, 1998.

DUBEY, J. P.; ZANKE, R.; THOMAS, N. J; WONG, S. K; VAN BONN, N; DAVIS, J. W.; EWING, R.; MENSE, M.; KWOK, O. C. H; BECKMEN, R. B.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis canis* like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 275-296, 2003.

DUBEY, J. P.; MERGL, J.; GEHRING, E.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; KWOK, O. C. H.; GRIGG, M. E.; SU, C.; MARTINEAU, D. Toxoplasmosis in captive dolphins (*Tursiops truncatus*) and a walrus (*Odobenus rosmarus*). **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 82–85, 2009.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. 317 p.

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

DUNN, J. L; BUCK, J. D; ROBECK, T. R. Bacterial diseases of cetaceans and pinnipeds. In DIERAUF, L. A; GULLAND, F. M. D. **CRC handbook of marine mammal medicine**. 2 ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001. Cap. 16, p. 309-336.

DURIEZ, P.; CLERMONT, O. BONACORSI, S.; BINGEN, E.; CHAVENTRÉ, A.; ELION, J.; PICARD, DENAMUR, E. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogeneicalle distributed among geographically distinct human populations. **Microbiology**, v. 147, n. 6, p. 1671-1676, 2001.

EVERMANN, J. F.; MCKEIRMAN, A. J.; EUGSTER, A. K. Update on canine coronavirus infections and interactions with other enteric pathogens of the dog. **Company Animal Practice**, v. 19, p. 6-122, 1988.

EWALT, D. R.; J. B. PAYEUR, B. M.; MARTIN, D. R.; CUMMINS, AND W. G. MILLER. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 4, p. 448–452, 1994.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIEBLING, S.; ALT, K.; ANTAÓ, E.M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BÖHNKE, U.; STEINRÜCK, H.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 3, p. 163-176, 2007.

FAINE S. **Guidelines for control of leptospirosis**. 1 ed. Geneva: World Health Organization, 1982. 98 p.

FENNER, F.; BACHMANN, P. A.; GIBBS, P. J.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Virologia veterinária**. 1. ed. Espanha: Acribia, 1987. 691 p.

FERREIRA, A. B. H. **Novo dicionário da língua portuguesa**. 2. ed.. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986. 1296 p.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI Jr., A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, p. 30-41, 2000.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, n. 11, p. 2688-2693, 2007.

GERACI, J. G.; LOUNSBURY, V. J. **Marine mammal ashore. A field guide for strandings**. 2. ed. Texas: A & M University Sea Grant College Program, 2005. 371 p.

GONZALES-VIERA, O.; MARIGO, J.; RUOPPOLO, V.; ROSAS, F. C. W.; KANAMURA, C. T.; TAKAKURA, C.; FERNÁNDEZ, A.; CATÃO-DIAS, J. L. Toxoplasmosis in a Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*) from Paraná, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 3-4, p. 358–62, 2013.

GREENE, C. E. Doenças bacterianas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina veterinária interna. Doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2004. Cap 85, p 410-421.

GREGORI, F. **Diarréia neonatal: desenvolvimento e avaliação de um método de Elisa para a detecção de rotavírus a partir de matéria fecal**. 1999. 113 f. Dissertação (mestrado), Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

GREVE, I. C.; ZERBINATI, J.; LEAL, R. F.; AMORIM, L. M. P. V.; SILVA, D. L.; OLIVEIRA, E. M. D.; CARMINATI, R. CERQUEIRA, R.B. Estudo comparativo da sensibilidade e especificidade dos testes antígeno acidificado tamponado (AAT) e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 5, n. 3, p. 255-263.

GROCH, K. R.; COLOSIO, A. C.; MARCONDES, M. C. C.; ZUCCA, D.; DIAZ-DELGADO, J.; NIEMEYER, C.; MARIGO, J.; BRANDAO, P. E.; FERNÁNDEZ, A.; CATÃO-DIAS, J. L. C. Novel cetacean morbillivirus in Guiana Dolphin, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, p. 511-513, 2014.

GROVES, M. G.; HARRINGTON, K. S.; TABOADA, J. Doenças frequentes sobre zoonoses. In: In ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina veterinária interna. Doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2004. Cap 84, p 402-409.

HALL, A.; HARWOOD, J. Mass mortalities. In: PERRIN, W. F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. **Encyclopedia of marine mammals**. San Diego: Academic Press, p 709-712, 2002.

HANKE, W.; DEHNHARDT, G. Sensory biology of aquatic mammals. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 199, n. 6, p. 417–420, 2013.

HERMANEZ-MORA, G.; PALACIOS-ALFARO, J. D.; GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R. Wildlife reservoirs of brucellosis: *Brucella* in aquatic environments. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 32, n.1. p. 89-103, 2013.

HILL, D.; DUBEY J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 10, p. 634–640, 2002.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. 1. ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 470 p.

HOMEM, V. S. F.; MENDES, Y. G.; LINHARES, A. C. Gastroenterite canina - agentes virais nas fezes de cães diarreicos e não diarreicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n.6. p. 531 - 536, 1999.

HOWARD, E. B.; BRITT, J. O.; MATSUMOTO, G. K.; ITHARA, R.; NAGANO, C. N. Bacterial diseases. In: HOWARD, E. B. (ed.) **Pathobiology of marine mammals diseases**. v. 1, 1 ed. Boca Raton: CRC Press, p. 69–118, 1983.

HUNT, T. D.; ZICCARDI, M. H.; GULLAND, F. M. D.; YOCHEM, P. K.; HIRD, D. W.; ROWLESS, T.; MAZET, J. A. K. Health risks for marine mammal workers. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 81, n.19. p. 81–92, 2008

INSTITUTO CHICO MENDES - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Portaria nº 78, de 3 de setembro de 2009**. Cria os Centros Nacionais de Pesquisa e Conservação. Diário Oficial da União. Poder Executivo, Brasília, DF, 4 set. 2009. Seção 1, p. 235-236.

IUCN 2012. **IUNC red list of threatened species**. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em 1 Out. 2013.

JENSEN, S. K.; AARS, J.; LYDERSEN, C.; KOVACS, K. M.; ASBAKK, K. The prevalence of *Toxoplasma gondii* in polar bears and their marine mammal prey: evidence for a marine transmission pathway? **Polar Biology**, v. 33, n. 5, p. 599–606, 2010.

JEREZ, J. A.; BRANDÃO, P. E.; BUZINARO, M. G.; GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarreia criados em vários municípios do estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 19-23, 2002.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261-272, 2000.

JORGE, R. S. P. **Caracterização do estado sanitário dos carnívoros selvagens da RPPN SECS Pantanal e de animais domésticos da região**. 2008. 105 f. Tese (doutorado). Epidemiologia experimental e aplicada às zoonoses da Faculdade de medicina veterinária e zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

KENNEDY-STOSKOPF, S. Viral diseases. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. **CRC handbook of marine mammal medicine**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. Cap. 15, p. 285-307.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L et al., Investigation of domestical animals and pets as a reservoir for intimin (eae) gene positive *Escherichia coli* types. **Veterinary Microbiology**, v.106, n. 1-2, p. 87-95, 2005.

KRUZE, M. V. Métodos de diagnóstico en el control de brucelosis bovina. II. Métodos serológicos. **Archives of Medicine Veterinary**, v. 7, n. 2, p. 52-64, 1975.

LANGE, R. R.; LANG, A.; ALBUQUERQUE, I. M. B.; JUNIOR, J. L. R.; NETO, L. C. Animais selvagens no Brasil. Das práticas em zoológico à especialização dos dias atuais. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 59, n. 19, p. 13-15. 2013.

LAPPIN, M. R. Feline zoonotic diseases. **Veterinary Clinical North American small animal practice**, v.23, n. 1, p57-77, 1993.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **Journal Clinical Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 1189-1193, 1992.

LI, L.; SHAN, T.; WANG, C.; CÔTÉ, C.; KOLMAN, J.; ONIONS, D. GULLAND, F.M.D.; DELWART, E. The fecal viral flora of California sea lions. **Journal of Virology**, v. 85, n. 19, p. 9909-9917, 2011.

LIMA, R. P.; ALVITE, C. M. C.; VERGARA-PARENTE, J.E. **Protocolo de reintrodução de peixe-boi marinho no Brasil**. São Luis: Ibama, 2007, v. 1. 62 p.

LOVATO; L.T.; DEZENGRINI, R. Coronavírus. In: FLORES, E.F. (ORG). **Virologia veterinária**. 1 ed. Santa Maria: UFSM, 2007. Cap. 24, p. 613-638.

LUNA, F. O.; PASSAVANTE, J. Z. O. **Projeto peixe-boi/ICMBio. 30 Anos de conservação de uma espécie ameaçada**. 1. ed. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2010. 108p.

LUNA, F.O., LIMA, R.P., ARAÚJO, J.P., PASSAVANTE, J.Z.O. Status de conservação do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758) no Brasil. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 10, n. 2, p. 145-153, 2008.

LUNA, F. O.; BONDE, R. K.; ATTADEMO, F. L. N.; SAUNDERS, J. W.; MEIGSFRIEND, G.; PASSAVANTE, J. Z. de O.; HUNTER, M. E. Phylogeographic implications for release of critically endangered manatee calves rescued in Northeast Brazil. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 22, n. 5, p. 665-672, 2012.

LUNA, F.O. **Population genetics and conservation strategies for the West Indian manatee (*Trichechus manatus* Linnaeus, 1758) in Brazil**. 2013. 237 f. Tese (Doutorado) – Programa de pós-graduação em oceanografia. Faculdade de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MACEDO, N. A.; MORAIS, Z. M.; CAMARGO, C. R. A.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S.; NURMBERGER JR, R.; VASCONCELLOS, S. A. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Pomona. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 194-200, 2004.

MANGINI, P. R.; SILVA, J. C. R. Medicina da Conservação: Aspectos gerais. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 75, p. 1258-1268.

MAQUART, M.; FARDINI, Y.; ZYGMUNT, M. S.; CLOECKAERT, A. Identification of novel DNA fragments and partial sequence of a genomic island specific of *Brucella pinnipedialis*. **Veterinary Microbiology**, v. 132, n.1-2, p. 182-189, 2008.

MARMONTEL, M.; HUMPHREY, S.R.; O'SHEA, T.J. Population viability analysis of the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*), 1976–1991. **Conservation Biology**, v. 11, n. 2, p. 467–48, 1997.

MARVULO, M. F. V.; DA SILVA, V. M. F.; MARTIN, A. R.; DÁFFONSECA NETO, J. A.; ROSAS, F. C. W.; NASCIMENTO, C. C.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA NETO, J. S.; SILVA, J. C. R. Serosurvey for antibodies against *Leptospira* sp. and *Brucella* sp. in free living Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*) and captive Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*). In Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, 15, 2003. Greensboro. **Anais...** Greensboro, 2003. p.104.

MARVULO, M. F. V. Zoonoses. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 74, p. 1250-1257.

MATHEWS, P. D.; DA SILVA, V. M. F.; ROSAS, F. C. W.; D’AFFONSECA NETO, J. A.; LAZZARINI, S. M.; RIBEIRO, D. C.; DUBEY, J. P.; VASCONCELLOS, S. A.; GENNARI, S. M. Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. in manatees (*Trichechus inunguis*) of the Brazilian Amazon. **Journal Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, n. 1, p. 85–88, 2012.

MCILHATTAN, T. J.; MARTIN, J. W.; WAGNER, R. J.; IVERSEN, J. O. Isolation of *Leptospira pomona* from a naturally infected California sea lion, Sonoma County, California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 7, n. 3, p. 195–197, 1971.

MCADARAGH, J. P.; EUSTIS, S. L.; NELSON, D. T.; STOTZ, I.; KENEFICK, K. Experimental infection of conventional dogs with canine parvovirus. **American Journal Veterinary Research**, v. 43, n. 4, p. 693-696, 1982.

MEASURES, L. N.; DUBEY, J. P.; LABELLE, P.; MARTINEAU, D. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Canadian pinnipedes. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, n. 2, p. 294-300, 2003.

MEBUS, C. A.; UNDERDAHL, N. R.; RHODES, M. B.; TWIEHAUS, M. J. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from field outbreak. **Agricultural experiment station. University of Nebraska, Monograph**, n. 233, p. 1-16, 1969.

MEBUS, C. A.; STAIR, E. L.; RHODES, M. B.; TWIEHAUS, M. J. Neonatal calf diarrhea: Propagation, attenuation and characteristics of a corona-like agent. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, n. 2, p. 173-178, 1973.

MIHINDUKULASURIYA, K.A.; WU, G.; LEGER, J.S.; NORDHAUSEN, R.W.; WANG, D. Identification of a novel coronavirus from a Beluga whale by using a panviral microarray. **Journal of Virology**, v. 82, n. 10, 5084-5088, 2008.

MOORE, M. J.; GAST, R. J.; BOGOLMONI, A. L. Marine vertebrate zoonoses: an overview of the DAO Special Issue. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 81, n. 19, p. 1-3, 2008.

MOORE, S. E. Marine mammals as ecosystem sentinels. **Journal of Mammalogy**, v.89, n. 3, p. 534–540, 2008.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; HILL, B. D. O'DONOGHUE, P.; LIMOR, J.; LAL, A.; THOMPSON, R. C. A. Detection of the *Cryptosporidium parvum* "Human" Genotype in a Dugong (*Dugong dugon*). **Parasitology**, v. 86, n.1, p. 1352-1354, 2000.

MURRAY E.; FOWLER, R.; MILLER, M. **Zoo & Wild Animal Medicine: Current Therapy**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999, 747 p.

NIELSEN, O.; STEWART, R. E. A.; NIELSEN, K.; MEASURES, L.; DUIGNAN, P. Serologic survey of *Brucella* spp. antibodies in some marine mammals of North America. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n 1, p. 89-100, 2001.

NIELSEN, K. A.; OWEN, H. C.; MILLS, P. C.; FLINT, M.; GIBSON, J. S. Bacteria isolated from dugongs (*Dugong dugon*) sub-mitted for postmortem examination in

Queensland, Australia, 2000–2011. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 44, n. 1, p. 35-41, 2013.

NYMO, I. H.; TRYLAND, M.; GODFROID, J. A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*). **Vetererinary Research**, v. 42, n. 1, p. 1-13, 2011

OLIVEIRA, S. J. de. **Guia bacteriológico prático: Microbiologia veterinária**. 2. ed.: Canoas: ULBRA, 2000. 240p.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD – OMS. Comité mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis. **Série de Informes Técnicos, 1986**. Genebra, 1986. 149 p.

PARENTE, C. L.; PARENTE, J. E. V.; LIMA, R. P. Strandings of Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*) in northeastern Brazil. **The Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 3, n. 1, p. 69-76, 2004

PEREIRA, M. G. Seleção dos participantes para estudo. In: PEREIRA, M. G. **Epidemiologia: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. Cap. 16, p. 337-357.

PERRIN, W. F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. **Encyclopedia of marine mammals**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2002, 1355 p.

PRENGER-BERNINGHOFF, E.; SIEBERT, M.; KÖNIG, A.; WEIB, R. BALJER, G. Incidence of *Brucella* species in marine mammals of the German North Sea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 81, n. 19, p. 65-71, 2008.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. 1. ed. Londrina: Planta. 2001. 327 p

PUGLIARES, K. R.; BOGOMOLNI, A.; TOUHEY, K. M.; HERZIG, S. M.; HARRY, C.,T.; MOORE, M. J. **Marine mammal necropsy: An introductory guide for stranding responders and field biologists**. 1. ed. Califórnia: Cape Code, 2007. 134 p.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

RECTOR, A.; BOSSART, G. D.; GHIM, S.; SUNDBERG, J. P.; JENSON, A. B.; RANST, M. V. Characterization of a novel close-to-root papillomavirus from a Flórida manatee by using multiply primed rolling-circle amplification: *Trichechus manatus latirostris* Papillomavirus Type 1. **Journal of Virology**, v. 78, n. 22, p. 12698-12702, 2004.

REDDY, M. L.; DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. Marine mammals as sentinels of ocean health. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. **CRC handbook of marine mammal medicine**. 2 ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001. Cap. 1, p 3-13.

REEP, R. L.; BONDE, R. K. **The Florida manatee biology and conservation**. Gainesville: University Press of Florida, 2006. 189 p.

RESENDES, O. C.; DOMINGO, M.; RAGA, J. A.; AGUSTI, C.; ALEGRE, F.; MONS, J. L. DUBEY, J. P.; ALMERA, S. Seoprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild dolphins from the Spanish Mediterranean coast. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 643-644, 2004.

REYNOLD III, J. E.; PERRIN, W. F.; REEVES, R. R.; MONTGOMERY, S.; RAGEN, T. J. **Marine mammal research: Conservation beyond crisis**. 1. ed. Maryland: Johns Hopkins University, 2005. 233 p.

RIDGWAY, S. H.; HARRISON, S. R. **Handbook of marine mammals. The sirenians and ballen whales**. v. 3. California: Academic Press, USA, 1985. 235 p.

ROSAS, F. C. W.; PIMENTEL, T. L. Order Sirenia (Manatees, Dugongs, Sea Cows). In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. **Biology, medicine and surgery of south American wild animals**. Iowa: Iowa State University Press, 2001. Cap. 31, p. 352-362.

ROSE, P. M. Florida manatees: An overview of their Status and future risks. In: Florida Marine Mammal Health Conference, III, 2008, St Augustine, Florida. **Anais...**, St Augustine, 2008.

ROSS, H. M.; FOSTER, G.; REID, R. J.; JAHANS, K. L.; MACMILLAN, A. P.. *Brucella* species infection in sea mammals. **Veterinary Record**, v. 134, n. 14, p. 359–359, 1994.

RUOPPOLO, V. **Patologia comparada de cetáceos e pinípedes**. 2003. 136 f. Dissertação (mestrado). Patologia experimental e comparada. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2003.

SABATÉ, M.; PRATS, G.; MORENO, E.; BALLESTÉ, E.; BLANCH, A.; ANDREU, A. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. **Research in Microbiology**, v. 159, n. 4, p. 288-293, 2008.

SAIDENBERG, A. B. S. **Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas**. 2008. 91f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SANTOS, P. S.; ALBUQUERQUE, G. R.; SILVA, V. M. F.; MARTINS, A. R.; MARVULO, M. F. V.; SOUZA, S. L. P.; RAGOZO, A. M. A.; NASCIMENTO, C. C.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-living Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*) from central Amazon, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 183, n. 1-2, p. 171-173, 2011.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; ROBERTSON, D.C.; LEVINE, M. M. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 4, p. 1450-1455, 1991.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLACEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KAMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GOLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NOCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 375-382, 2008.

SCHOLZ, H. C.; NOCKLER, K.; GOLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KAMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; DE, B. K. *Brucella inopinata* sp nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 801-808, 2010.

SCHAEFER, A. M.; GOLDSTEIN, J. G.; REIF, J. S.; FAIR, P. A.; BOSSART, G. D. Antibiotic-resistant organisms Cultured from Atlantic Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) Inhabiting Estuarine waters of Charleston, SC and Indian River Lagoon, FL. **EcoHealth**, v. 6, n. 1, p. 33-41, 2009.

SHINOHARA, G. M. M.; NOBRE, M. A. **Introdução ao editor de estruturas e equações químicas Isis Draw 2.4: Aplicações em química orgânica**. 1. ed: Presidente Prudente: LaCCeF, 2004. 91 p.

SILVA, A. B.; MARMONTEL, M. Ingestão de lixo plástico como provável causa mortis de peixe-boi amazônico (*Trichechus Inunguis* NATTERER, 1883). **UAKARI**, v. 5, n. 1, p. 105-112, 2009.

SILVA, J. C. R.; MARVULO, M. F. V.; PICANÇO, M. C.; LIMA, R. P.; VERGARA-PARENTE, J. E.; MARCONDES, M. C. C; FERREIRA, P. M.; MORAIS, Z. M.; OGASSAWARA, S.; VASCONCELLOS, S. A.; JOSÉ SOARES FERREIRA-NETO, J. S. Pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, *Leptospira interrogans* e *Brucella abortus* em peixes-bois-marinheiros (*Trichechus manatus manatus*) mantidos em cativeiro. In: Congresso da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, X, 2001, São Paulo. **Anais...** ABRAVAS, São Paulo, Brazil. P. 27.

SILVA, J. C. R.; Toxoplasmose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 43, p. 726-735.

SMITH, W. A.; MAZET, J. A. K.; HIRSH, D. C. *Salmonella* in California wildlife species: Prevalence in rehabilitation centers and characterization os isolates. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 33, n. 3, p. 228-235, 2002.

STACY-PHIPPS S.; MECCA J. J.; WEISS, J. B. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during the course of infection. **Journal Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1054-1059, 1995.

STAMPER, M. A.; GULLAND, F. M. D.; SPRAKER, T. Leptospirosis in rehabilitated Pacific harbor seals in California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 2, p. 407-410, 1998.

STODDARD, R. A.; ATWILL, E. R.; GULLAND, F. M.; MILLER, M. A.; DABRITZ, H. A.; PARADIES, D. M.; WORCESTER, R.K.; JANG, S. LAWRENCE, J.; BYRNE, B.A.; CONRAD, P. A. Risk factors for infection with pathogenic and antimicrobial-

resistant fecal bacteria in northern elephant seals in California. **Public Health Reports**, v. 123, n. 3, p.360-370, 2008a.

STODDARD, R. A.; DELONG, R. L.; BYRNE, B. A.; GULLAND, F. M. D. Prevalence and characterization of *Salmonella* spp. among marine animals in the Channel Islands, California. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 81, n. 19, p. 5-11, 2008b.

STOLEN, M. K.; BARLOW, J. A model life table for Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Indian River Lagoon System, Florida, USA. **Marine Mammal Science**, v.19, n. 4, p. 630-649, 2003.

SULZNER, K.; JOHNSON, C. K.; BONDE, R. K.; GOMEZ, N. A.; POWELL, J.; NIELSEN, K.; PAGE LUTTRELL, M.P.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; AGUIRRE, A. A. Health assessment and seroepidemiologic survey of potential pathogens in wild Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*). **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1-11, 2012.

TAMS, T. R. **Handbook of small animal gastroenterology**. 1. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2003, 486 p.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; TARDELLI-GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. v. 1. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 718 p.

TRYLAND, M.; KLEIVANE, L.; ALFREDSSON, A.; KJELD, M.; ARNASON, A. Q.; STUEN, S.; GODFROID, J. Evidence of *Brucella* infection in marine mammals in the North Atlantic ocean. **Veterinary Record**, v. 144, n. 21, p. 588-592, 1999.

TRYLAND, M., NESBAKKEN, T, ROBERTSON, L., GRAHEK-OGDEN, D., LUNESTAD, B. T. Human Pathogens in Marine Mammal Meat – A Northern Perspective. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, n. 8, p. 1-18, 2013.

UHEN, M. D. Evolution of marine mammals: back to the sea after 300 million years. **The Anatomical Record**, v. 290, n. 6, p.514-522, 2007.

VEDROS, N. A.; SMITH, A. W.; SCHONEWALD, J.; MIGAKI, G.; HUBBARD, R. C. Leptospirosis epizootic among California sea lions. **Science**, v. 172, n. 1, p. 1250-1251, 1971.

VERGARA-PARENTE, J. E.; LUNA, F. O.; TEIXEIRA, M. F. S.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Primeiro registro de *Salmonella* sp. em peixe-boi marinho no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, XXII, 2001, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2001. P. 27.

VERGARA-PARENTE, J. E.; SIDRIM, J. J. C; PESSOA, A. P. B de P.; PARENTE, C. L.; MARCONDES, M. C. C; TEIXEIRA, M. F.; ROCHA, M. F. G. Bacterial flora of upper respiratory tract of captive Antillean manatees. **Aquatic Mammals**, v. 29, n. 1, p. 124-130, 2003a.

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

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A.P.; SHRIRAM, A.N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **Journal Bioscience**, v. 33, n. 4, p. 557–569, 2008.

WALKER, R. D. Teste de sensibilidade antimicrobiana e interpretação dos resultados. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.; DOWLING, P. M. **Terapia antimicrobiana em medicina veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2010. Cap 2, p. 11-25.

WALTZEK, T. B.; CORTE' S-HINOJOSA, G.; WELLEHAN JR., J. F. X.; GRAY, G. C. Marine mammal zoonoses: a review of disease manifestations. Review article. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, n. 8, p. 521-535, 2012.

8 APÊNDICES

APÊNDICE A: Protocolo de colheita e armazenamento das amostras selecionadas.

Agente Etiológico	Material Biológico colhido	Procedimento para colheita	Armazenamento
Rotavírus	Fezes	Luva descartável e pote estéril	Congelador -20°C
Coronavírus	Fezes	Luva descartável e pote estéril	Congelador -20°C
Enterobactérias	Swab retal, nasal, oral, genital e abscesso	Meio stuart	Temperatura ambiente. Máximo 48h
<i>Escherichia coli</i>	Swab retal, nasal, oral, genital e abscesso	BHI glicerinado	Temperatura ambiente. Máximo 48h
<i>Samonella</i> spp.	Swab retal	Meio stuart	Temperatura ambiente. Máximo 48h
<i>Leptospira</i> spp.	Sangue/soro sanguíneo	Tubo a vácuo sem anticoagulante.	Congelador -20°C
<i>Brucella abortus</i>	Sangue/soro sanguíneo	Tubo a vácuo sem anticoagulante.	Congelador -20°C
<i>Toxoplasma gondii</i>	Sangue/soro sanguíneo	Tubo a vácuo sem anticoagulante.	Congelador -20°C

APÊNDICE B: Resultado dos exames de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e anti-*Toxoplasma gondii* realizados nos peixes-bois marinhos em cativeiro do Brasil.

ID	Sexo	Anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. Resultado – Sorovares – Títulos	Anticorpos anti- <i>T. gondii</i> Resultado – Títulos
1	M	Negativo	Negativo
2	M	Negativo	Negativo
3	F	Negativo	Negativo
4	F	Negativo	Negativo
5	F	Negativo	Negativo
6	F	Negativo	Negativo
7	M	Autumnalis (800), Icterohaemorrhagiae (200), Butembo (100)	Negativo
9	M	Negativo	Negativo
10	F	Negativo	Negativo
11	F	Negativo	Negativo
12	M	Negativo	Negativo
13	M	Negativo	Positivo (500)
14	F	Brastislava (800), Australis (400), Autumnalis (400), Panama (400), Icterohaemorrhagiae (400), Pomona (200), Copenhageni (100), Butembo (200)	Negativo
15	M	Negativo	Positivo (50)
16	M	Negativo	Positivo (50)
17	M	Negativo	Negativo
18	M	Australis (1600), Icterohaemorrhagiae (100), Pomona (100)	Negativo
19	M	Negativo	Negativo
20	M	Bataviae (200)	Negativo
21	M	Negativo	Negativo
22	M	Negativo	Negativo
23	M	Negativo	Negativo
24	M	Negativo	Negativo
25	F	Negativo	Negativo
26	M	Negativo	Negativo
27	F	Negativo	Positivo (3200)
28	F	Icterohaemorrhagiae (1600)	Negativo
29	F	Negativo	Negativo
30	F	Negativo	Negativo
31	M	Negativo	Negativo
32	F	Negativo	Negativo
33	F	Negativo	Negativo
			Continua

ID	Sexo	Anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. Resultado – Sorovares – Títulos	Anticorpos anti- <i>T. gondii</i> Resultado – Títulos
34	F	Negativo	Positivo (25600)
35	F	Negativo	Negativo
36	M	Negativo	Negativo
37	F	Negativo	Positivo (50)
38	M	Negativo	Negativo
39	F	Negativo	Negativo
40	M	Negativo	Negativo
42	F	Negativo	Negativo
43	F	Negativo	Negativo
46	M	Negativo	Negativo
47	F	Negativo	Negativo
48	F	Negativo	Negativo
50	F	Negativo	Negativo
51	M	Negativo	Negativo
55	F	Negativo	Negativo
56	M	Negativo	Negativo
57	F	Negativo	Negativo
58	M	Negativo	Negativo
59	F	Negativo	Negativo
61	M	Negativo	Negativo
79	M	Negativo	Negativo
80	M	Negativo	Negativo
81	F	Negativo	Negativo

Legenda: M: macho. F: fêmea.

ID	Sexo	Idade	Tipo de Swabe	Resultado	Neo	Amp	Amo	Pen	Tet	Gen	Eri
92	M	Filhote	Anal	<i>E. coli</i>	-	S	S	S	S	-	I
92	M	Filhote	Nasal	<i>E. coli</i>	-	S	S	R	S	-	R
92	M	Filhote	Genital	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	S	S	S	S	-	S
92	M	Filhote	Oral	<i>Streptococcus</i> sp.	-	S	S	R	S	-	R

Legenda: Neo: neomicina. Amp: ampicilina. Amo: amoxicilina. Pen: penicilina. Tet: tetraciclina. Gen: gentamicina. Eri: eritrominica. R: resistente. S: sensível. I: intermediário.

APÊNDICE D: - Recomendações de Manejo e de Biossegurança (Protocolo Operacional Padrão - POP) para Instituições Mantenedoras de Peixe-Boi Marinho em Cativeiro

Os peixes-bois marinhos por serem ameaçados de extinção no manejo em cativeiro deve ser mantido sempre o estado de alerta quanto a saúde dos animais, realizando a pesquisa científica, o monitoramento e a vigilância epidemiológica. Para a padronização destas atividades é recomendada a adoção das medidas de biossegurança, protocolo operacional padrão - POP e manejo a serem adotados.

Cuidados no ambiente

Deve realizar o controle rigoroso de animais sinantrópicos e pragas nas áreas de manejo e permanência dos animais, assim como nos locais de armazenamento e preparo dos alimentos. É recomendável o uso de telas.

- A. Colocar pedilúvios com produtos desinfetante, atóxico e não abrasivo na entrada e saída da área destinada aos animais (recintos, área de preparo e fornecimento de alimento), com rodízio semanal. Utilizar na diluição sempre água limpa e a solução deve ser trocada diariamente.
- B. Realizar a conduta diária de limpeza dos recintos onde tenha a presença de animais, com desinfecção da água e retirada das fezes o mais breve possível.
 - a. Utilizar água tratada previamente com cloro líquido, entretanto somente após a verificação da diminuição da concentração de cloro que deve ser permitida a presença de animais.
 - b. Realizar a análise dos parâmetros físicos e químicos da água (pH, ureia, turbidez, cloro, salinidade).
 - c. Nos locais onde houver possibilidade de tratamento de ozônio, esta metodologia poderá ser adotada.
- C. Utilizar para a retirada das fezes recipiente sem peneiração (tipo balde ou semelhante), evitando que as fezes dissolvidas na água contaminem o ambiente. Utilizar material exclusivo para cada recinto.
- D. Realizar a desinfecção imediata após o uso dos equipamentos e materiais utilizados e descartes dos fômites utilizados no manejo dos animais;
- E. Realizar diariamente a desinfecção das áreas de preparo de alimento (chão, bancadas e utensílios) com um dos produtos abaixo, preferencialmente alternando o uso entre

eles. O produto deve ser utilizado com luva, sapato fechado e máscara e esperar a secagem antes de permitir a presença de pessoas ou animais.

- a. Hipoclorito de sódio 1%.
- b. Glutaldeído 2%.
- c. Lysoform bruto[®].

Cuidado com os animais

- A. Seguir protocolo de avaliação laboratorial e das medidas de biometria dos animais de acordo com a idade, com exceção de animais doentes que devem ter a frequência de acordo com o tratamento prescrito pelo médico veterinário.
 - a. Neonatos (até 30 dias): uma vez por semana.
 - b. Filhotes de dois a seis meses: quinzenalmente.
 - c. Filhotes de sete a 24 meses: mensalmente.
 - d. Juvenis de dois a seis anos: bimestralmente.
 - e. Adultos: trimestralmente.
- B. Realizar limpeza dos animais com esponja ou escova de cerdas macias, em todo o corpo, evitando a face e utilizando sabão antisséptico (Clorexidina 2%) ou PVPI dergemante (uso tópico) em filhotes ao menos uma vez ao mês e nos demais animais nos dias de manejo e biometria conforme cronograma supracitado.
- C. Realizar colheita de material e diagnósticos hematológico (hemograma e bioquímica sérica), parasitário (endoparasitas, protozoários), viral (rotavírus, coronavírus, morbilivírus, papilomavírus), bacteriológico (hemocultura, *Salmonella* spp., enterobactérias, *Mycobacterium* spp.) e sorológico (toxoplasmose, leptospirose e brucelose) em todos peixes-bois marinhos no momento exato de sua chegada à instituição, mantendo-o em quarentena até a estabilização do animal e verificação dos resultados negativos para as análises realizadas. Para o plantel de animais cativos, além dos exames hematológicos que devem ser seguidos conforme cronograma supracitado deverá ser realizado uma pesquisa dos agentes mencionados ao menos uma vez ao ano, gerando relatório da saúde dos animais periodicamente.
- D. Realizar colheita de material e diagnósticos nos animais antes e após a mudança de recinto, registrando a atividade (data, recinto, animais presentes em ambos os recintos,

análises laboratoriais realizadas, comportamentos antes e após a mudança) em planilha.

- E. Nos animais soropositivos para anticorpos anti-*Leptospira* spp devem ser realizados exames seriados com intervalo de sete dias durante três semanas.
- F. Os exames que não forem conclusivos com teste de triagem devem ser repetidos com testes mais específicos.
- G. Nos animais em que tenha sido isolado algum agente etiológico selecionado deve ser realizado exames para que se verifique se o animal está eliminando o agente e a tentativa de identificação da fonte de infecção.
- H. Em toda colheita, manter uma amostra em microtubo armazenado a -20°C de soro sanguíneo e sangue total; uma lâmina de esfregaço sanguíneo fixada com Panótico, uma amostra mínima de 5 g de fezes congelada em pote estéril e uma amostra de fezes conservada em AFA. Manter estas informações em banco de dados padronizados.
- I. Realizar a descrição de quaisquer sinais clínicos que o animal apresente, mesmo que a princípio não haja associação entre estas informações, mantendo sempre atualizada a ficha clínica dos animais em formato digital e impresso.
- J. Padronizar e manter banco de dados de informações quanto ao histórico, mudança de recinto, clínica, manejo dos animais e identificação dos indivíduos em que teve contato em cativeiro.
- K. Controlar o uso de antibióticos nos animais cativos procurando sempre que possível realizar exames de teste de sensibilidade antimicrobiana antes da escolha do fármaco, evitar repetições de um mesmo antibiótico e fazer planilha individual dos antibióticos utilizados.
- L. Realizar a higienização e desinfecção com hipoclorito de sódio dos alimentos fornecidos aos animais.

Cuidado com funcionários (técnicos, tratadores e voluntários)

- A. Antes e após o manejo com os animais ou manipulação dos alimentos, a mão e antebraço deveram ser lavados com sabão antisséptico, alternando a cada semana os produtos antissépticos. Após a lavagem, utilizar papel-toalha para a secagem das

mãos. Manter unha sempre limpa e aparada. Utilizar os seguintes produtos para a limpeza e desinfecção:

- a. Sabão antisséptico clorexidina 2%.
 - b. Gel antisséptico com solução alcoólica 70%.
 - c. PVPI 10%.
- B. Evitar utilização de mesmo tratador para o manejo com os filhotes e adultos.
- C. Durante o preparo e fornecimento dos alimentos, os funcionários devem utilizar luva de procedimento, máscara e touca descartáveis, sapatos fechados. As roupas devem ser trocadas diariamente.
- D. Nas atividades de manejo dos animais, técnicos, tratadores e demais envolvidos, devem estar com luva de procedimento, máscara e touca descartáveis e sapatos de neoprene.
- E. Realizar periodicamente trabalhos de ensino de Educação em Saúde com os técnicos e tratadores informando sobre a necessidade de adoção das medidas higiênicas sanitárias e conscientizando quanto a necessidade de uso de Equipamentos de Proteção Individual – EPIs.
- F. Realizar exames periódicos relacionados à doenças com potencial zoonótico nos técnicos e tratadores, assim como verificar a vacinação periódica para raiva, tétano e Febre Amarela destes funcionários.

9 ANEXOS

ANEXO A: Licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio.



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 20685-4	Data da Emissão: 12/09/2013 16:35	Data para Revalidação*: 12/10/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Fernanda Löffler Niemeyer Atademo	CPF: 073.122.037-44
Título do Projeto: Estudo epidemiológico e de fatores de risco de doenças em peixe-boi marinho (<i>Trichechus manatus</i>) no Brasil	
Nome da Instituição: universidade federal rural de PE	CNPJ: 24.416.174/0001-06

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Colheita de material biológico em Pernambuco	07/2009	05/2011
2	Colheita de material biológico em Alagoas	07/2009	05/2011
3	Colheita de material biológico na Paraíba	07/2009	08/2011
4	envio e análise de material para laboratório	07/2009	01/2012
5	análise de material em laboratório	07/2009	03/2012
6	Colheita de material biológico de animais reintroduzidos	03/2010	05/2011
7	Colheita de material biológico de animais nativos	01/2011	12/2011
8	Elaboração programa de biossegurança	12/2011	04/2013
9	Finalização da pesquisa e entrega dos resultados finais	07/2012	01/2014

Observações e ressalvas

1	As atividades do campo ocorridas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, na qual especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	INES DE LIMA SERRANO	Pesquisadora	517.219.704-44	2060272 SSP-PE	Brasileira
2	Jean Carlos Ramos da Silva	Pesquisador orientador	623.269.644-00	3.429.942 SSP-PE	Brasileira
3	Rinaldo Aparecido Mota	Pesquisador	596.539.816-65	3048854 SSP-MG	Brasileira
4	Vanessa de Oliveira Ribeiro	Pesquisadora de iniciação científica	089.030.496-06	MG-10865798 PC-MG-MC	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 58353296



Página 1/3