GLÁUCIA PEREIRA DE SOUSA

Investigação de infecções por *Brucella* e *Morbillivirus* em cetáceos e
sirênios nas regiões Norte e Nordeste do Brasil

São Paulo
2019

GLÁUCIA PEREIRA DE SOUSA

Investigação de infecções por *Brucella* e *Morbillivirus* em cetáceos e sirênios nas regiões Norte e Nordeste do Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Lara Borges Keid

De acordo: _____
Orientador

São Paulo
2019

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3849
FMVZ

Sousa, Gláucia Pereira de
Investigação de infecções por *Brucella* e *Morbillivirus* em cetáceos e sirênios nas
regiões Norte e Nordeste do Brasil / Gláucia Pereira de Sousa. – 2019.
123 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Lara Borges Keid.

1. *Brucella*. 2. *Morbillivirus*. 3. Sirênios. 4. Cetáceos. 5. Brasil. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação de infecções por Brucella e Morbillivirus em cetáceos e sirênios nas regiões Norte e Nordeste do Brasil", protocolada sob o CEUA nº 6053030317 (ID 003525), sob a responsabilidade de **Lara Borges Keid e equipe; Gláucia Pereira de Sousa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 12/04/2017.

We certify that the proposal "Investigation of Brucella and Morbillivirus infection in cetacean and sirenian in the North and Northeast of Brazil.", utilizing 80 Brazilian wild species (males and females), protocol number CEUA 6053030317 (ID 003525), under the responsibility of **Lara Borges Keid and team; Gláucia Pereira de Sousa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/12/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 03/2017 a 03/2019

Área: **Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal**

Origem:	Amostras biológicas estocadas	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 50 anos	N:	40
Espécie:	Espécies silvestres brasileiras			Peso:	10 a 500 kg		
Linhagem:	Espécies: Trichechus inunguis						
Origem:	Amostras biológicas estocadas	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 50 anos	N:	30
Espécie:	Espécies silvestres brasileiras			Peso:	10 a 500 kg		
Linhagem:	Espécies: Trichechus manatus						
Origem:	Amostras biológicas estocadas	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 50 anos	N:	10
Espécie:	Espécies silvestres brasileiras			Peso:	10 a 30000 kg		
Linhagem:	Cetáceos de várias espécies						

Registro IBAMA/Sisbio/Etc: Licença SISBIO nº 45568-1.

Método de Captura: Os animais não serão capturados na natureza. Serão amostrados peixes-boi de cativeiro, mantidos em tanques nas instituições acima mencionadas. No caso de cetáceos, serão utilizados animais encalhados, encontrados mortos ou vivos, em programas de monitoramento do CMA/ICMBio. Serão utilizadas tanto carcaças provenientes do acervo do CMA/ICMBio quanto de animais que forem submetidos à necropsia durante o desenvolvimento deste projeto.

Local do experimento: As amostras obtidas serão processadas no Laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar da FZEA-USP.

São Paulo, 26 de agosto de 2019

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 19 de junho de 2019
CEUA N [6053030317](#)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Lara Borges Keid
Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal

Título da proposta: "Investigação de infecções por Brucella e Morbillivirus em cetáceos e sirênios nas regiões Norte e Nordeste do Brasil".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 004826)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 09/junho/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Na proposta original estava prevista a investigação de infecções pelos seguintes patógenos em amostras de mamíferos aquáticos brasileiros: Giardia e Cryptosporidium, Leptospira, Mycobacterium e Morbillivirus. Devido a um atraso na obtenção dos recursos necessários para o desenvolvimento da proposta, houve uma mudança no projeto, de maneira que o número de patógenos investigados foi reduzido, de maneira que as amostras serão analisadas apenas quanto a infecções por Brucella e Morbillivirus. Assim, o título da proposta foi alterado para: Investigação de infecções por Brucella e Morbillivirus em cetáceos e sirênios nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. No projeto em anexo, o número de animais amostrados também foi atualizado. ".

Comentário da CEUA: "".

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUSA, Gláucia Pereira de

Título: **Investigação de infecções por *Brucella* e *Morbillivirus* em cetáceos e sirênios nas regiões Norte e Nordeste do Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho à minha amada família e aos mamíferos aquáticos, seres maravilhosos que guardarei sempre em meu coração.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre esteve ao meu lado e, mesmo diante das dificuldades, me conduziu à realização de mais esse sonho em minha vida.

Aos meus pais, José Raimundo Vieira e Jussara Pereira, pelo amor, dedicação, confiança e incentivo em todos os momentos da minha existência.

Aos meus irmãos Tatiana Pereira, Angélica Pereira e Thiago Pereira por todo o carinho e conselhos que me deram ao longo desses anos.

À Universidade de São Paulo (USP) pela concretização do meu sonho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa para o desenvolvimento do projeto “Avaliação Sanitária de Sirênios Brasileiros” (processo FAPESP número 2017/19760-6), do qual o presente trabalho é parte.

À Profa Dra Lara Keid por ter aceitado me orientar, pela amizade, pelo aprendizado, por ter me ajudado em todas as etapas desse trabalho e pela enorme paciência.

Ao Prof Dr Rodrigo Soares pelo apoio em várias situações, pelos ensinamentos e dedicação.

À Fernanda Niemeyer e Fábria Luna pelos anos de atividades juntas, pela amizade, incentivo para ingressar no mestrado e apoio nessa jornada.

À equipe do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos-ICMBio/CMA pelo apoio e companheirismo.

À Acadebio e à Sede do ICMBio (CGGP, Coordenações e DIBIO) por concederem a licença capacitação para finalizar as análises laboratoriais e créditos do mestrado.

Às minhas amigas Daniella Ribeiro, Thalita Fanta e Jaqueline Diniz pelo carinho, cooperação no laboratório, conselhos, aprendizagem e pelos momentos felizes que estivemos juntas.

Às amigas Shara Farias e Vanessa Reis pelo carinho, conselhos e por estarem presentes em grandes momentos da minha estadia em Pirassununga.

Aos amigos Alex, Leandro, Marissol e todos do CECSBE pela amizade e apoio durante minha permanência na cidade.

Ao Danival Lopes, da Secretaria do VPS/FMVZ a Pós-Graduação pela paciência, dedicação e gentileza.

Ao João Metzner do VPS e Ni Devitto pela amizade, apoio e pelos momentos de descontração.

Aos servidores, técnicos e tratadores do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Marinha do Nordeste-ICMBio/CEPENE em Itamaracá-PE pelo carinho e apoio durante esses anos e pelo envolvimento na conservação dos peixes-bois-marinhos.

Aos servidores, técnicos e tratadores do ICMBio/Apa Costa dos Corais em Alagoas por todo o apoio ao longo desses anos e empenho nas questões relacionadas aos peixes-bois-marinhos.

À equipe do Centro de Preservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos (CPPMA) localizado na usina hidrelétrica de Balbina-AM pelo apoio nas coletas, envio de amostras e envolvimento na conservação dos peixes-bois-da-amazônia.

Aos veterinários João Carlos Borges e Vanessa Rebelo e a toda a equipe da Fundação Mamíferos Aquáticos (FMA) pela dedicação nas atividades envolvendo os peixes-bois-marinhos, apoio nas coletas e envio de amostras.

Aos servidores, técnicos e tratadores do ICMBio/APA Barra de Mamanguape-PB pelo apoio e dedicação aos peixes-bois-marinhos da Paraíba.

Aos veterinários Jairo Moura e Ianny Posiadlo, técnicos e tratadores do ZOOFIT/UNAMA pela hospitalidade, apoio nas coletas de amostras e carinho pelos peixes-bois-da-amazônia.

À equipe do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais-ICMBio/CEPTA pela gentileza, acolhimento e grande apoio ao CMA, disponibilizando laboratórios e alojamento sempre que foi solicitado.

RESUMO

SOUSA, G.P. **Investigação de infecções por *Brucella* e *Morbillivirus* em cetáceos e sirênios nas regiões Norte e Nordeste do Brasil**. 2019. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Os mamíferos aquáticos são susceptíveis a infecções por uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e parasitas, com destaque às infecções por *Brucella* e *Morbillivirus*, as quais vêm sendo evidenciadas em uma ampla variedade de espécies de mamíferos marinhos em diversas localidades geográficas. Nos mamíferos marinhos, a brucelose é causada pelas espécies *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis*, tendo os cetáceos e os pinípedes como hospedeiros preferenciais, respectivamente. A estirpe 27 (ST27) de *Brucella ceti* é considerada zoonótica. Nos cetáceos e pinípedes, os morbillivirus têm o potencial de causar grandes epidemias com mortalidade em massa das espécies acometidas, podendo ocasionar extinções locais em virtude da tendência cíclica desta infecção. Ambas as infecções já foram registradas em cetáceos marinhos no Brasil, incluindo a recente descrição de epizootia associada a alta mortalidade de botos-cinza (*Sotalia guianensis*) no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de infecções por *Brucella* spp. e *Morbillivirus* em cetáceos e sirênios nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Foram analisados 57 peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) incluindo animais cativos, reintroduzidos e de vida livre, 84 peixes-boi amazônicos cativos (*Trichechus inunguis*) e 23 cetáceos, compreendendo amostras de animais vivos e provenientes do banco de amostras de instituições. Foram obtidas amostras de tecidos, swabs nasais, genitais, orais e anais e sangue, as quais foram utilizadas para o diagnóstico direto das infecções, pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Amostras de soro foram submetidas ao teste sorológico do antígeno acidificado tamponado (AAT) para detecção de anticorpos anti-*Brucella*. Os animais com resultados positivos nos testes sorológicos e/ou moleculares para brucelose, tiveram suas amostras analisadas pelo cultivo microbiológico. Amostras positivas nas reações moleculares foram submetidas à caracterização molecular para a confirmação do resultado e caracterização da estirpe bacteriana e/ou viral. Todos os sirênios analisados apresentaram resultado negativo no teste do AAT para sorodiagnóstico de *Brucella*, bem como nas reações moleculares para detecção de

Brucella e morbilivírus em amostras de *swabs*, tecidos e sangue. Dentre os cetáceos analisados, um espécime de boto-cinza (*Sotalia guianensis*), macho, encontrado encalhado em Pernambuco, apresentou resultado positivo na PCR para detecção de *Brucella* spp. em amostra de rim, tendo sido identificada a espécie *B. ceti*. O isolamento bacteriano não foi bem-sucedido. Num segundo espécime de boto-cinza (*S. guianensis*), fêmea, encalhada em Alagoas, foi detectado morbilivírus em amostras de fígado e rim. De acordo com os resultados obtidos, não foram verificadas evidência de infecções por *Brucella* e *Morbillivirus* em sirênios no Brasil. Este corresponde ao segundo relato no Brasil de infecção por *Brucella* nessa espécie de cetáceo, sendo o primeiro relato de infecção por morbillivirus em boto-cinza na região nordeste. Estes resultados alertam para a importância do monitoramento sanitário sistemático desses patógenos, particularmente nesta espécie de golfinho, em especial devido ao potencial zoonótico da brucelose e do morbillivirus de causar imunossupressão, o que predispõe a infecções secundárias, e epizootias com alta mortalidade.

Palavras-chave: *Brucella*. *Morbillivirus*. Sirênios. Cetáceos. Brasil.

ABSTRACT

SOUSA, G.P. **Investigation of *Brucella* and *Morbillivirus* infections in cetaceans and sirenians in northern and north-eastern Brazil.** 2019. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Aquatic mammals are susceptible to infections by a variety of microorganisms, including bacteria, fungi, viruses and parasites, with emphasis on *Brucella* and *Morbillivirus* infections, which have been evidenced in a wide variety of marine mammal species in several geographical locations. In marine mammals, brucellosis is caused by *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*, having the cetaceans and pinnipeds as the preferred hosts, respectively. Strain 27 (ST27) of *B. ceti* is considered zoonotic. In cetaceans and pinnipeds, morbilliviruses have the potential to cause large epidemics with mass mortality of the affected species with potential to cause local extinctions due to the cyclic tendency of this infection. Both infections have been reported in marine cetaceans in Brazil, including a recent described morbillivirus infection associated with an unusual mass mortality of Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) in Rio de Janeiro, RJ, Brazil. The objective of the present study was to investigate the occurrence of *Brucella* spp. and *Morbillivirus* infections in cetaceans and sirenians in the northern and north-eastern regions of Brazil. Fifty-seven marine manatees (*Trichechus manatus*) were analysed including captive, reintroduced and free-living animals, 84 captive Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*) and 23 cetaceans were analysed, comprising samples from live animals and from the bank of samples from institutions. Tissue samples, nasal, genital, oral and anal swabs and blood, which were used for direct diagnosis of the infections using the polymerase chain reaction (PCR). Sera was used to detect anti-*Brucella* antibodies through the buffered acidified antigen test (BAAT). The animals with positive results in serological and/or molecular tests for brucellosis had their samples analysed by microbiological culturing. Positive samples in the molecular reactions were subjected to the sequencing of amplified products to confirm the results and characterize the detected bacterial and/or viral strain detected. All the sirenians analysed were negative in the BAAT test for *Brucella* serodiagnosis, as well as through the PCR for the detection of *Brucella* and morbillivirus. Among the cetaceans analysed, a specimen of male Guiana dolphin (*S. guianensis*), found stranded in Pernambuco, had a *Brucella* positive PCR

result in a kidney sample, with the identification of *B. ceti*. Bacterial isolation was not successful. In a second specimen of female Guiana dolphin found stranded in Alagoas, morbillivirus was detected in liver and kidney samples. According to the results obtained, there was no evidence of *Brucella* and *Morbillivirus* infections in manatees in Brazil. Regarding the cetaceans, this is the second report in Brazil of *Brucella* infection in this cetacean species, and the first report of morbillivirus infection in Guiana dolphin in the north-eastern Brazilian regions. These results highlight for the importance of conducting systematic health monitoring of these pathogens, particularly in this dolphin species, because of the zoonotic nature of *Brucella* infections and the potential of morbilliviruses to cause immunosuppression, predisposing infected animals to secondary infections, and epizooties with high mortality.

Keywords: *Brucella*. *Morbillivirus*. Manatees. Cetaceans. Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio para visualização o de produtos amplificados na reação em cadeia pela polimerase para detecção de <i>Brucella spp</i> em amostras de fragmentos de órgãos de mamíferos aquáticos, utilizando <i>primers</i> que têm como alvo a sequência de inserção IS711 (PCR-IS711).....	50
Figura 2. Achados macroscópicos verificados em espécime de boto-cinza (<i>Sotalia guianensis</i>) com resultado positiva para <i>Brucella</i> pela reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	51
Figura 3. Análise filogenética de <i>Morbillivirus</i> detectado em <i>Sotalia guianensis</i> no Brasil, utilizando-se sequências parciais do gene codificador da RNA polimerase viral..	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Valores de avaliação de estresse dos peixes-boi marinhos (<i>Trichechus manatus</i>) manejados, com pontuações baseadas nos sinais vitais. Fonte: ATTADEMO, 2014.	38
Quadro 2. Nomenclatura, sequência, região alvo e referência bibliográfica dos <i>primers</i> utilizados para detecção direta de <i>Brucella spp.</i> e <i>Morbillivirus</i> em amostras biológicas de mamíferos aquáticos.	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. BRUCELOSE	21
2.2. MORBILIVIROSE	27
3. JUSTIFICATIVA.....	33
4. OBJETIVOS.....	34
5. MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1. ANIMAIS	35
5.2. AMOSTRAS BIOLÓGICAS	39
5.3. EXAMES LABORATORIAIS	40
5.3.1. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE BRUCELOSE.....	40
5.3.2. EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE SWABS.....	41
5.3.3. EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	41
5.3.4. EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE TECIDOS.....	42
5.3.5. EXTRAÇÃO DE RNA DAS AMOSTRAS DE TECIDOS E DE SWABS NASAIS.....	42
5.3.6. REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA PARA OBTENÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR (DNAc)	42
5.3.7. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA A DETECÇÃO DE <i>BRUCELLA</i>	43
5.3.8. REAÇÃO DE <i>NESTED</i> -PCR PARA A DETECÇÃO DE PARAMIXOVÍRUS	45
5.3.9. VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	47
5.3.10. SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS.....	47
5.3.11. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE BRUCELOSE	48
6. RESULTADOS.....	49
6.1. RESULTADOS DA INVESTIGAÇÃO DE BRUCELOSE NOS SIRÊNIOS	49

6.2. RESULTADOS DA INVESTIGAÇÃO DE BRUCELOSE NOS CETÁCEOS	49
6.3. RESULTADOS DA INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR PARAMIXOVÍRUS NOS SIRÊNIOS	51
6.4. RESULTADOS DA INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR PARAMYXOVÍRUS NOS CETÁCEOS	52
7. DISCUSSÃO	53
8. CONCLUSÃO	60
9. REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

Os mamíferos aquáticos compreendem os cetáceos, sirênios, mustelídeos e pinípedes. Os cetáceos agrupam os odontocetos (baleias com dentes e golfinhos) e os mysticetos (baleias com barbatanas); os sirênios são os peixes-boi; os mustelídeos são as lontras e as ariranhas; e os pinípedes são os elefantes-marinho, leões-marinho, lobos-marinho e as focas (HETZEL; LODI, 1993; BARNES et al., 1985).

A ordem Sirenia é composta por duas famílias: Dugongidae e Trichechidae. A família Dugongidae possui como representantes duas espécies: *Hydrodamalis gigas* (conhecida como vaca de Steller, extinta desde o século XVIII) e *Dugong dugon* (conhecido como Dugongo, existente nas regiões tropicais dos oceanos Índico e Pacífico); a família Trichechidae apresenta três espécies: *Trichechus senegalensis* (peixe-boi africano), que ocorre na costa africana entre os países do Senegal e Angola; *Trichechus inunguis* (peixe-boi-da-Amazônia), ocorrente em toda Bacia Amazônica; *Trichechus manatus* (peixe-boi-marinho), que se encontra dividida em duas subespécies: *Trichechus manatus latirostris*, presente na América do Norte e *Trichechus manatus*, que ocorre na América Central e América do Sul (PERRINE; RIPPLE, 2002; HARTMAN, 1979; POWELL, 2002).

Os sirênios são animais herbívoros que habitam ambientes rasos de rios, estuários e mar (HARTMAN, 1979). De acordo com DEUTSCH et al. (2008), o peixe-boi-marinho está classificado globalmente como “vulnerável à extinção” na *The International Union for Conservation of Nature’s (IUCN) Red List of Threatened Species* (IUCN, 2019) e consta no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção como espécie “em perigo” (ICMBio/MMA, 2018). O peixe-boi-da-Amazônia está atualmente classificado como vulnerável pela *IUCN Red List of Threatened Species* (MARMONTEL et al., 2016) e também consta no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção como vulnerável à extinção (ICMBio/MMA, 2018). Os peixes-boi vêm sofrendo diversas pressões antrópicas, tais como pressão de caça, captura incidental em redes de pesca e redução de habitats, que podem ocasionar extinção próxima ou futura da espécie (IBAMA, 2001).

Até o momento, foram registradas no Brasil 46 espécies de cetáceos, sendo oito de grandes baleias (mysticetos) e 38 de odontocetos (MIRANDA et al., 2019). As espécies de mysticetos são mais abundantes na costa brasileira nos meses de inverno

e primavera (WILLIAMSON, 1975; CÂMARA; PALAZZO, 1986; ZERBINI et al., 1996, 1997; SICILIANO, 1997 *apud* ZERBINI et al., 2004). Segundo o ICMBio/MMA (2018) as espécies de cetáceos ameaçadas de extinção que ocorrem no Brasil são: baleia-franca-do-sul (*Eubalaena australis*), baleia-sei (*Balaenoptera borealis*), baleia-azul (*Balaenoptera musculus*), baleia-fin (*Balaenoptera physalus*), boto-cinza (*Sotalia guianensis*), boto-vermelho (*Inia geoffrensis*), cachalote (*Physeter macrocephalus*) e toninha (*Pontoporia blainvillei*).

Os mamíferos aquáticos são susceptíveis a infecções por uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e parasitas (COWAN, 2002). Alguns são considerados patógenos oportunistas (HIGGINS, 2000). Os microrganismos essencialmente patogênicos se apresentam em quantidade reduzida, no entanto, ocasionam enfermidades com prognósticos desfavoráveis, sendo que muitos podem apresentar potencial zoonótico (GERACI; LOUNSBURY, 2005).

Dentre as infecções que ocorrem nos mamíferos aquáticos, destacam-se a brucelose, que é uma zoonose já detectada na maioria das famílias de cetáceos (CASSLE et al., 2013) e as infecções por *Morbillivirus* pela elevada mortalidade que pode acarretar nas espécies acometidas. Nos cetáceos, as infecções por *Brucella* foram associadas a quadros clínicos reprodutivos, respiratórios, cutâneos, osteoarticulares e neurológicos, ocorrendo também infecções assintomáticas (GUZMÁN-VERRI et al., 2012). Já as infecções por *Morbillivirus* podem acarretar quadros respiratórios e neurológicos, podem levar à imunossupressão e consequentemente a infecções secundárias. (VAN BRESSEM et al., 2014).

Os patógenos encontrados em mamíferos aquáticos podem afetar o crescimento de populações nativas e aumentar o risco de extinção de populações pequenas, que aliados a fatores antrópicos, podem provocar a perda de biodiversidade (VAN BRESSEM et al., 2009). Suspeita-se que causas ambientais e antropogênicas como interação com pesca, efluentes despejados na água como esgoto ou contaminantes químicos, mudanças climáticas e reduzida oferta de alimentos possam aumentar a propensão dos animais a doenças emergentes com a recorrência de epidemias (CUBAS et al., 2014).

De acordo com HOWARD et al. (1983) e DUNN et al. (2001), as doenças bacterianas são as principais causas de morbidade e mortalidade de mamíferos marinhos, no entanto, pouco se conhece sobre o seu impacto nas populações de sirênios (ATTADEMO, 2014). A mortalidade de animais em cativeiro por enfermidades

infecciosas é geralmente atribuída a tratamentos inadequados da água ou alterações ambientais (HOWARD et al., 1983; CUBAS et al., 2014).

As relações entre a saúde pública e a saúde dos oceanos são crescentes devido ao aumento contínuo do número de pessoas vivendo em áreas costeiras, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Vários agentes infecciosos presentes em hospedeiros marinhos, incluindo agentes bacterianos, virais e protozoários podem resultar em doenças infecciosas em humanos (KNAP et al., 2002; SOSIN et al., 2006), podendo ter impactos na saúde pública. A presença de surtos de doenças e de grande mortalidade desses animais podem ser importantes indicadores de desequilíbrios ecológicos, de introdução de novas espécies ou enfermidades, de mudanças climáticas, alteração do habitat ou poluição local (TABOR, 2002).

Com o atendimento de encalhes desses animais e sua manutenção em oceanários ou centros de reabilitação, os profissionais de saúde que realizam manejo ou pessoas que mantenham algum tipo de contato com os mamíferos aquáticos estão sujeitos à infecção com organismos estritamente patogênicos dos animais (STROUD; ROFFE, 1979; ODEGAARD; KROGSrud, 1981) como também com microrganismos oportunistas, que podem fazer parte da microbiota do animal (JOHNSTON; FUNG, 1969; SCHOROEDER et al., 1985; BUCK; SPOTTE, 1986) ou que se encontram no ambiente marinho ou de oceanários (WIEBE; LISTON, 1972; SASAKI; MINETTE, 1985; CHANG; PIEN, 1986). Algumas zoonoses documentadas em seres humanos foram ocasionadas por infecções adquiridas durante necropsia e/ou processamento subsequente de tecidos obtidos de animais infectados (WEBSTER et al., 1981; SMITH et al., 1978; SARGENT, 1980).

As carcaças de mamíferos marinhos podem ser levadas pelas correntes marinhas para as regiões litorâneas e permanecer nestes locais por um longo período. Assim, há ainda a probabilidade de transmitirem enfermidades para animais domésticos e selvagens que habitam as áreas costeiras (FOSTER et al., 2002).

A avaliação sanitária sistemática de mamíferos aquáticos poderá fornecer informações de relevância, possibilitando não só uma melhor compreensão de aspectos relacionados à imunopatogenia e epidemiologia de enfermidades transmissíveis que acometem estes animais, mas também auxiliar em programas de conservação, na manutenção da qualidade ambiental, além de proteção quanto à transmissão de zoonoses.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. BRUCELOSE

A brucelose é uma zoonose que pode acometer os seres humanos e diversas espécies de animais domésticos e selvagens (NAVARRO et al., 2002; SZYFRES, 2001; BRICKER, 2002).

Atualmente, são reconhecidas doze espécies no gênero *Brucella*, incluindo as seis espécies clássicas e uma variedade de novas espécies e estirpes que foram descritas ao longo dos últimos anos. As espécies podem ser diferenciadas entre si com base nos seus hospedeiros preferenciais e em suas características fenotípicas e genotípicas. Com base nestas características, muitas espécies são ainda divididas em diferentes biovariantes.

As seis espécies consideradas clássicas descritas são *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae* (CORBEL; BANAI, 2005). *B. abortus* é dividida em sete biovariantes sendo responsável pela brucelose nos bovinos e bubalinos (MEYER; SHAW, 1920); a *B. melitensis*, composta por três biovariantes, é responsável pela infecção nos caprinos e ovinos (MEYER; SHAW, 1920); no caso da *B. suis*, as biovariantes 1 e 3 causam brucelose nos suínos domésticos (*Sus scrofa domesticus*) e nos javalis (*Sus scrofa scrofa*), a variante 2 foi associada à lebre europeia (*Lepus capensis*), a biovariante 4 está associada a infecções em renas e caribus (*Rangifer tarandus*) e a biovariante 5 foi isolada de roedores silvestres (TRAUM, 1914; TESSARO; FORBES, 1986; CORBEL, 1997; KREIZINGER et al., 2014); a *B. neotomae* foi isolada do roedor da espécie *Neotoma lepida* nos Estados Unidos (STOENNER; LACKMAN, 1957). Dentre as espécies clássicas, há ainda a *B. canis* e *B. ovis* que possuem como hospedeiros preferenciais, respectivamente, os cães e ovinos (BUDDLE, 1956; CARMICHAEL; BRUNER, 1968).

Infecções por *Brucella* em mamíferos marinhos foram identificadas primeiramente em meados da década de 1990 e os isolados obtidos destes animais evidenciaram características fenotípicas e genotípicas distintas das seis espécies clássicas de *Brucella* até então descritas (FOSTER et al., 2002). Estas novas espécies foram denominadas *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis*, tendo como hospedeiros preferenciais os cetáceos e pinípedes, respectivamente (FOSTER et al., 2007).

A espécie *B. microti* foi isolada de diversas espécies animais. Inicialmente foi identificada em *Microtus arvalis*, um roedor silvestre na República Tcheca (SCHOLZ et al., 2008b), posteriormente na raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) e javalis na Europa (SCHOLZ et al., 2009; RÓNAI et al., 2015), além de ter sido isolada de amostras de solo (SCHOLZ et al., 2008a). A *B. inopinata* foi isolada de um implante mamário em um paciente humano, porém até o momento não foi identificado qual o hospedeiro animal desta espécie (SCHOLZ et al., 2010). *B. papionis* foi isolada de babuínos (*Papio* sp.) mantidos em cativeiro nos Estados Unidos e foi associada à ocorrência de episódios de abortamento e infertilidade nesta espécie (WHATMORE et al., 2014). Finalmente, a *B. vulpis* foi isolada de raposas vermelhas (*V. vulpes*) na Áustria (SCHOLZ et al., 2016a). As espécies *B. microti*, *B. inopinata* e *B. vulpis* são consideradas como pertencentes a um grupo de brucelas “atípicas” por exibirem características fenotípicas distintas e por se apresentarem geneticamente mais distantes em relação às demais espécies descritas.

Outras variantes “atípicas” de *Brucella*, também foram isoladas de pacientes humanos que apresentavam quadros de pneumonia (TILLER et al., 2010b), de roedores silvestres (TILLER et al., 2010a), de diversas espécies de anfíbios de cativeiro provenientes de várias localidades na Europa, África, Ásia, América do Sul, Central e Oceania (SCHOLZ et al., 2016b), assim como de um espécime de cativeiro da arraia *Taeniura lymma* (EISENBERG et al., 2017).

Muitas das espécies e variantes de *Brucella* recentemente descritas são caracterizadas por serem bactérias móveis, ativas metabolicamente, capazes de sobreviverem no solo e em condições ambientais desfavoráveis, resistentes a acidez elevada e apresentarem alta capacidade de se adaptarem em hospedeiros não específicos, como por exemplo em anfíbios (EL-SAYED; AWAD, 2018).

O gênero *Brucella* abrange organismos na forma de pequenos cocobacilos Gram-negativos, medindo de 0,5-0,7 µm de diâmetro e 0,6-1,5 µm de comprimento, são imóveis (com exceção de algumas espécies e variantes atípicas), aeróbias ou capnofílicas, intracelulares facultativas, catalase-positivas, oxidase-positivas, redutoras de nitratos em nitritos, urease-positivas (exceto algumas espécies), indol-negativas, negativas para a liquefação de gelatina e não produtoras de ácido a partir de carboidratos em meios convencionais (CORBEL; BANAI, 2005; FOSTER et al., 2007; SCHOLZ et al., 2008b; GUZMÁN-VERRI et al., 2012; WHATMORE et al., 2014; SCHOLZ et al., 2016a; SCHOLZ et al., 2016b; EISENBERG et al., 2017).

Por apresentarem características antigênicas distintas, as bactérias do gênero *Brucella spp* podem ser classificadas em dois grupos: lisas e rugosas, devido a composição do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular bacteriana. O LPS das estirpes lisas é composto por lipídeo A, núcleo oligossacarídeo e cadeia O, já no grupo das rugosas há somente o lipídeo A e o núcleo oligossacarídeo. Dentre as seis espécies clássicas de *Brucella* são classificadas como lisas *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. neotomae* e como rugosas *B. ovis* e *B. canis* (CORBEL, 1997; CORBEL; BANAI, 2005). Os isolados provenientes de mamíferos aquáticos foram classificados como cepas lisas (GUZMÁN-VERRI et al., 2012).

As espécies do gênero *Brucella* apresentam elevada similaridade genética entre si, de maneira que a precisa identificação de isolados deve basear-se não só no perfil fenotípico dos mesmos, mas também no perfil demonstrado em inúmeros marcadores genéticos (VERGER et al., 1985).

Assim, a caracterização genotípica dos isolados de *Brucella* pode ser feita por meio do sequenciamento *multilocus* (*Multilocus Sequence Typing* – MLST) empregando protocolos que envolvem o sequenciamento de nove a 21 genes constitutivos da bactéria (WHATMORE et al., 2007, 2016), análise de restrição enzimática dos genes *omp2a* e *omp2b* (CLOECKAERT et al., 1995, 2001; DAWSON et al., 2008) e ainda pela análise de marcadores microssatélites (BRICKER et al., 2003; LE FLÈCHE et al., 2006; MAQUART et al., 2009; WHATMORE et al., 2006).

Os isolados de *Brucella* provenientes de mamíferos marinhos possuem características genéticas e fenotípicas distintas em comparação com mamíferos terrestres (THAKUR et al., 2012). Estudos que realizaram a caracterização genotípica de isolados de *Brucella* provenientes destes animais por meio da técnica de MLST, na América do Norte, permitiram a identificação de diversos genótipos, relacionados à localidade geográfica e diferentes espécies de hospedeiro (WHATMORE et al., 2017).

Desde a década de 1990, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas na tentativa de elucidar a epidemiologia da brucelose nos mamíferos aquáticos e alguns estudos indicam que 50% das famílias de cetáceos apresentam anticorpos mensuráveis para o antígeno de *B. ceti*. (CASSLE et al., 2013).

Infecções por *Brucella* foram evidenciadas por métodos sorológicos em diversas espécies de cetáceos e pinípedes, em lontras, ursos polares e peixes-boi marinhos (GUZMÁN-VERRI et al., 2012; ATTADEMO, 2014; SÁNCHEZ-

SARMIENTO, 2018). Além de evidências sorológicas, a infecção já foi confirmada por meio do isolamento bacteriano em diversas espécies de mamíferos marinhos. De acordo com FOSTER et al. (2007), os primeiros isolamentos de *Brucella* em mamíferos marinhos foram provenientes de focas comuns (*Phoca vitulina*), toninha (*Phocoena phocoena*) e golfinho comum (*Delphinus delphis*) na Escócia (ROSS et al., 1994) e golfinho nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) nos EUA (EWALT et al., 1994). Desde esses primeiros relatos, houve outros isolamentos e o número de hospedeiros se expandiu significativamente, incluindo diversas espécies de cetáceos e pinípedes marinhos (FOSTER et al., 2002; GUZMAN-VERRI et al., 2012; SUÁREZ-ESQUIVEL et al., 2017).

Estudos baseados em métodos moleculares de diagnóstico também vêm sendo utilizados para a investigação da infecção em cetáceos e pinípedes, utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), possibilitando a confirmação da infecção em casos nos quais o isolamento bacteriano não foi possível (DUNCAN et al., 2014; BUCKLE et al., 2017; BURGESS et al., 2017; SANCHEZ-SARMIENTO et al., 2017; ATTADEMO et al., 2018).

A infecção não foi relatada, até o momento, em golfinhos de água doce, peixes-boi-amazônicos ou dugongos (GUZMÁN-VERRI et al., 2012). Em peixes-boi marinhos, houve apenas positividade em reações sorológicas, as quais não foram até o momento confirmadas por testes moleculares ou pelo isolamento da bactéria (ATTADEMO, 2014).

Dentre os isolados de *Brucella* provenientes de mamíferos marinhos, a estirpe 27 (ST27), identificada com base no sequenciamento *multilocus* (WHATMORE et al., 2007) é considerada zoonótica, tendo sido associada a infecções humanas, inclusive em pacientes que não relataram contato direto com mamíferos aquáticos, mas sim a ingestão de frutos do mar crus (SOHN et al., 2003; MCDONALD et al., 2006). Também foi relatada uma infecção humana por *Brucella* de origem marinha devido a exposição laboratorial a culturas (BREW et al., 1999).

Os isolados de *Brucella spp.* de mamíferos marinhos também têm potencial de ocasionar brucelose em animais terrestres. A doença foi induzida em leitões, bovinos e ovinos por meio de inoculações experimentais, utilizando-se cepas de *Brucella* provenientes de mamíferos marinhos (THAKUR et al., 2012).

No Brasil a infecção por *Brucella* foi investigada em 161 botos-vermelhos de vida livre (*Inia geoffrensis*) provenientes da Reserva de Desenvolvimento Sustentável

de Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil e não foram verificadas evidências sorológicas ou microbiológicas de infecção (ROCCA, 2014). Peixes-bois-amazônicos também foram negativos para a infecção por meio de testes sorológicos (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2018).

De acordo com ATTADEMO (2014), na pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* lisa realizada em 58 peixes-boi marinhos, do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos, localizado na Ilha de Itamaracá, Pernambuco, Brasil) e reintroduzidos nos Estados da Paraíba e Alagoas (animais soltos em ambiente natural após reabilitação em cativeiro), foi executada a triagem com o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) utilizando como antígeno *Brucella abortus* (cepa 1119-3). Dentre os peixes-boi avaliados, seis foram positivos no exame de triagem. Porém, no exame confirmatório, realizado com o teste de fixação de complemento, todas as amostras foram negativas.

SÁNCHEZ-SARMIENTO et al. (2019) relataram a presença de anticorpos anti-*Brucella* lisa nas seguintes espécies de cetáceos no Brasil: *Feresa attenuata*, *Globicephala macrorhynchus*, *Tursiops truncatus*, *Stenella clymene* e *Peponocephala electra*.

Recentemente foi detectada infecção por *Brucella* spp. por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em golfinhos clímene (*Stenella clymene*) encalhados nos Estados do Ceará e Alagoas, Brasil (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2017; ATTADEMO et al., 2018), sendo que no caso identificado no estado de Alagoas, foi possível realizar o sequenciamento de três dos nove genes analisados no ensaio de sequenciamento *multilocus*, possibilitando identificar a espécie como *B. ceti* (ATTADEMO et al., 2018).

Num estudo posterior, SÁNCHEZ-SARMIENTO et al. (2019) também evidenciaram, por meio da PCR, infecções por *Brucella* spp. nas seguintes espécies de cetáceos no Brasil: *Stenella clymene*, *Stenella longirostris*, *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei*, porém, a identificação das espécies de *Brucella* causadoras da infecção não foi realizada.

Apesar das evidências sorológicas e moleculares, até o momento não houve isolamento de *Brucella* em mamíferos aquáticos brasileiros.

Nos animais domésticos, os sinais clínicos mais comuns envolvem quadros de abortamento no terço final da gestação, a repetição de cio em fêmeas sadias, epididimite e orquite nos machos. Nos cetáceos, os sinais clínicos da infecção

dependem dos órgãos acometidos, suscetibilidade e presença de coinfeções (THAKUR et al., 2012) e os mesmos nem sempre são evidentes, apesar da alta soroprevalência detectada (BOSSART, 2011). Animais com diagnóstico sorológico positivo ou mesmo com isolamento de *Brucella* de tecidos podem não apresentar sinais clínicos óbvios ou patologia associada (FOSTER et al., 2002; HERNÁNDEZ-MORA et al., 2009), indicando que possam atuar como portadores assintomáticos da infecção (GUZMÁN-VERRI et al., 2012). Em cetáceos, os sinais clínicos relatados foram relacionados a abortamentos, orquite e epididimite, infertilidade, alterações osteoarticulares e respiratórias, meningoencefalite, cardiopatias, lesões de pele e morte (GUZMÁN-VERRI et al., 2012).

A forma de transmissão da *Brucella* entre os mamíferos marinhos é pouco conhecida, porém, há indícios de que a infecção pode ser propagada por via vertical e horizontal (EWALT et al., 1994; CFSPH, 2007). Uma sugestão seria que a *Brucella* seja transmitida por contato direto entre os animais, como no momento do acasalamento ou contato oronasal com fetos abortados e secreções provenientes do abortamento (GUSMÁN-VERRI et al., 2012). *B. ceti* foi isolada dos sistemas reprodutivos de cetáceos infectados e de leite de fêmeas lactantes (HERNÁNDEZ-MORA et al., 2008; MAQUART et al., 2009a; GONZÁLEZ-BARRIENTOS et al., 2010). Uma outra via corresponde à transmissão vertical da mãe ao feto, por terem sido identificadas grandes quantidades de *Brucella* em fetos e na placenta de animais infectados (HERNÁNDEZ-MORA et al., 2008; MAQUART et al., 2009a; GONZÁLEZ-BARRIENTOS et al., 2010).

Uma outra hipótese seria a infecção por *Brucella* através da ingestão de peixes contaminados, uma vez que já foi provada a suscetibilidade de peixes a infecções por *Brucella* (EL TRAS et al., 2010; NYMO et al., 2016) ou vetores helmintos. Nematódeos pulmonares do gênero *Pseudalius* foram encontrados nos pulmões de toninha-comum (*Phocoena phocoena*) e continham grandes quantidades de *Brucella* em seus tecidos (DAWSON et al., 2008).

O diagnóstico sorológico da infecção por *Brucella* é geralmente baseado na utilização de testes laboratoriais padronizados para o diagnóstico da infecção em animais domésticos (TRYLAND et al., 1999; TACHIBANA et al., 2006; SANCHEZ-SARMIENTO et al., 2018, 2019). O perfil da resposta imune humoral à infecção por *Brucella* em mamíferos aquáticos ainda é pouco conhecido, de maneira que resultados falso-positivos e falso-negativos podem ocorrer e os resultados obtidos

nestes testes devem ser interpretados com cautela (MEEGAN et al., 2010, 2012). Alguns testes sorológicos foram desenvolvidos para diagnóstico da infecção em odontocetos, porém, não estão disponíveis comercialmente, o que dificulta seu emprego rotineiro (HERNÁNDEZ-MORA et al., 2009; MEEGAN et al., 2010, 2012).

O diagnóstico direto é essencial para a confirmação de casos, os quais podem ser baseados no cultivo microbiológico e nos testes moleculares, como a PCR (GUZMÁN-VERRI et al., 2012; THAKUR et al., 2012). O isolamento da bactéria em cultivo é necessário para a adequada caracterização da estirpe de *Brucella* associada à infecção, o que pode trazer informações importantes sobre a epidemiologia da infecção (LOPEZ-GOÑI et al., 2008; WHATMORE et al., 2006, 2007; 2016).

A brucelose é uma infecção de difícil tratamento, sendo o mesmo proibido nos animais de produção infectados, para os quais programas de controle determinam a eutanásia dos animais positivos no Brasil (LAGE et al., 2006). Os antibióticos precisam penetrar em quantidades adequadas nos macrófagos e serem estáveis no meio intracelular, para que o tratamento seja eficiente em eliminar a infecção (FUGIER et al., 2007). Usualmente são utilizados dois ou mais antibacterianos associados, os quais envolvem: doxiciclina, ciprofloxacina, trimetropim-sulfa-metoxazol, estreptomicina, gentamicina e rifampicina (PAPPAS et al., 2005; FUGIER et al., 2007).

CASSLE et al. (2013) realizaram o tratamento utilizando rifampicina e doxiciclina em uma fêmea de *T. truncatus* com abscessos pulmonares decorrentes de infecção por *Brucella*, obtendo melhoria da condição clínica do animal e redução dos abscessos.

Também foi realizado antibioticoterapia em um filhote de cachalote pigmeu (*Kogia breviceps*) e após dois meses de administração, o título de anticorpos diminuiu gradualmente, tornando-se não detectável (KATSUMATA et al., 2004).

2.2. MORBILIVIROSE

A família Paramyxoviridae, pertencente à ordem Mononegavirales, divide-se nas subfamílias Avulavirinae, Metaparamyxovirinae, Orthoparamyxovirinae e Rubulavirinae. O gênero *Morbillivirus* pertence à subfamília Orthoparamyxovirinae, sendo composto, atualmente, por sete espécies virais: vírus do sarampo (*Measles virus*), vírus da cinomose canina (*Canine distemper virus* – CDV), vírus da peste dos

pequenos ruminantes, vírus da peste bovina, morbilivírus felino, morbilivírus dos cetáceos (*Cetacean morbillivirus* - CeMV) e morbilivírus das focas (*Phocine distemper virus* – PDV) (ICTV, 2016).

Os morbilivírus são vírus envelopados, pleomórficos, geralmente esféricos, com cerca de 150 nm de diâmetro e um envelope lipídico e possuem genoma RNA de fita simples linear, não segmentado e polaridade negativa. O nucleocapsídeo viral possui simetria helicoidal e diâmetro de aproximadamente 13 a 18 nm. O RNA viral codifica duas glicoproteínas (a hemaglutinina H e a proteína de fusão F), a proteína de matriz (M), a nucleoproteína (N) e duas grandes proteínas (L e P) que são constituintes da RNA polimerase viral (KNIPE; HOWLEY, 2001, 2013; ICTV, 2016).

Em 1988, foi feito o primeiro relato de um vírus semelhante ao da cinomose canina (CDV), responsável por mortalidade elevada em populações de focas comuns no Mar do Norte e Mar Báltico, nas quais foram detectados anticorpos anti-CDV. O vírus detectado foi denominado *Phocid distemper vírus-1* (PDV-1) após se demonstrar que era distinto do CDV apesar de se relacionar antigenicamente com este (VISSER et al., 1993). Em cetáceos, as primeiras ocorrências de infecções por morbillivirus resultaram da detecção de antígenos em órgãos de toninha (*Phocoena phocoena*) que encalharam na costa da Irlanda durante o surto de PDV-1 de 1988. Este patógeno foi denominado morbillivirus das toninhas (*Porpoise morbillivirus* - PMV) (KENNEDY et al., 1988; MCCULLOUGH et al., 1991).

Desde então, inúmeros relatos de infecções por morbillivirus vêm sendo descritos em diversas espécies de mamíferos marinhos e as seguintes variantes virais são bem reconhecidas dentro dos CeMV: o PMV, o morbillivirus de golfinhos (*Dolphin Morbillivirus* - DMV) e morbillivirus de baleia piloto (*Pilot Whale Morbillivirus* - PWMV), relatados no hemisfério norte (BARRETT et al., 1993; TAUBENBERGER et al., 2000; GROCH et al., 2014; ICTV, 2016). Recentemente, novas variante virais foram descritas, como o morbillivirus da baleia-bicuda (*Beaked Whale Morbillivirus* – BWMV) (VAN BRESSEM et al., 2014), uma nova variante isolada de golfinho roaz-do-Índico (STEPHENS et al., 2014) e o morbilivírus do boto-cinza ou golfinho das Guianas (*Guiana Dolphin morbillivirus* – GDMV) este último, identificado no Brasil (GROCH et al., 2014). O PMV e o DMV são antigenicamente mais relacionados aos morbillivirus de ruminantes e ao vírus do sarampo (MV) do que ao vírus da cinomose (VAN BRESSEM et al., 2014).

Infecções por morbilivírus podem ocasionar altas taxas de mortalidade em cetáceos, especialmente em populações indenes, podendo acarretar encalhes em massa e vêm sendo descritas em diversas espécies animais, em várias localidades geográficas (BELLIÈRE et al., 2011; RUBIO-GUERRI et al., 2013; VAN BRESSEM et al., 2014; DI GUARDO; MAZZARIOL, 2014; STEPHENS et al., 2014; VISSER et al., 1993; BELLIÈRE et al., 2011; RUBIO-GUERRI et al., 2013; DI GUARDO et al., 2011; KEMPER et al., 2016; GROCH et al., 2018).

Nos anos de 1987 e 1988 foi verificado um aumento da mortalidade, estimada em 50%, de golfinhos-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*) na costa dos Estados Unidos, de Nova Jersey à Florida, associada a infecção por morbillivirus, causada pelo DMV (LIPSCOMB et al., 1994).

No período de 2006 a 2008 e em 2011 houve uma mortalidade atípica de golfinhos listrados (*Stenella coeruleoalba*) no Mediterrâneo (FERNANDEZ et al., 2008; RAGA et al., 2008; RUBIO-GUERRI et al., 2013; SIERRA et al., 2018), associada a infecção por morbillivirus. Outra epidemia ocorreu no Estreito de Gibraltar, onde a população de baleias-piloto de nadadeiras longas diminuiu 26,2% em cinco anos após um surto epizootico por morbillivirus (VERBORGH et al., 2016; SIERRA et al., 2018).

Em sirênios, evidências sorológicas da infecção já foram demonstradas, por meio da detecção de anticorpos neutralizantes para morbillivirus em peixe-boi da Florida (DUIGNAN et al., 1995c) e em peixes-boi marinhos em Belize, nos quais baixos títulos de anticorpos neutralizantes para CDV e DMV/PMV foram detectados em 4% (4/112) dos peixes-boi amostrados. Contudo, a infecção até o momento não foi confirmada utilizando-se métodos diretos de diagnóstico como o isolamento viral ou testes moleculares. A presença de títulos positivos baixos pode ser indicativo de exposição ao patógeno, com infecções nas quais a replicação viral é insuficiente para causar a manifestação da doença ou de reações inespecíficas, não indicando infecção (SULZNER et al., 2012).

A primeira descrição de infecção por morbilivírus em mamíferos aquáticos na América do Sul e no Brasil foi feita por GROCH et al. (2014), ao descrever a infecção em um boto-cinza (*S. guianensis*) encontrado encalhado no litoral do Espírito Santo, em 2010, sendo a primeira descrição da variante GDMV.

Posteriormente, no período de novembro de 2017 a fevereiro de 2018, um surto causado por este agente viral provocou a mortalidade de mais de 250 botos-cinzas

(*S. guianensis*) na região Sudeste do Brasil (GROCH et al., 2018; GROCH et al., 2019), no Estado do Rio de Janeiro. Cinquenta por cento dos indivíduos observados na Baía Grande e Baía de Sepetiba, no Rio de Janeiro, foram considerados emaciados. Alguns espécimes apresentaram sinais neurológicos, respiratórios e cutâneos (FLACH et al., 2019). Na ocasião, foi identificada a variante GDMV.

O morbillivirus dos cetáceos, assim como outras espécies de morbillivirus são vírus linfotrópicos e epiteliotrópicos, sendo comumente associados ao comprometimento do sistema nervoso central (SNC). As infecções virais são associadas a quadros agudos, com sinais clínicos que incluem perda de peso, dificuldade respiratória, descarga nasal e ocular úlceras na mucosa oral, alterações gastrintestinais e neurológicas, com alterações comportamentais, além de estarem associadas à imunossupressão (VAN BRESSEM et al., 2014). Os cetáceos acometidos por morbilivirose geralmente vêm a óbito em consequência de uma broncopneumonia viral aguda, meningoencefalite viral muitas vezes associadas a infecções secundárias por fungos ou bactérias e imunossupressão devido à depleção linfoide (VAN BRESSEM et al. 2014; WEST et al., 2014; FAUQUIER et al., 2017; DÍAZ-DELGADO et al., 2019). As lesões características da infecção são associadas a depleção linfoide, com linfocitólise evidente, verificada em linfonodos e baço; pneumonia intersticial e broncointersticial, com infiltrado inflamatório composto por linfócitos, macrófagos e plasmócitos, fibrose, hiperplasia de pneumócitos tipo II, células sinciciais e inclusões virais em pneumócitos tipo I e II e macrófagos (SIERRA et al., 2018; DÍAZ-DELGADO et al., 2019).

Animais que sobrevivem às infecções agudas podem apresentar, posteriormente infecções secundárias por outros microrganismos, levando à mortalidade devido à imunossupressão. Nestes animais, muitas vezes não há detecção de lesões teciduais diretamente associadas ao vírus, porém antígenos e ácidos nucleicos virais podem ser detectados nos tecidos, sugerindo a ocorrência de infecções crônicas sistêmicas (STEPHENS et al., 2014; VAN BRESSEM et al., 2014).

Há especulações sobre a possibilidade de ocorrência de infecções crônicas, associadas ao SNC em animais que se recuperaram da fase aguda (REIDARSON et al., 1998; BOSSART et al., 2010; VAN BRESSEM et al., 2014; DI GUARDO; MAZZARIOL, 2016). SOTO et al. (2011) relataram a ocorrência de dois padrões de infecção viral em *S. coeruleoalba* no Mediterrâneo, sendo uma delas caracterizada por infecções sistêmicas, associadas à mortalidade em massa de animais, com

quadros de pneumonia intersticial, depleção linfóide e encefalite não supurativa e detecção viral em todos os órgãos acometidos; e a segunda caracterizada por infecções restritas ao SNC, identificada em animais encontrados encalhados meses após a epizootia, sendo que a ausência viral em órgãos linfóides e respiratórios sugere que estes animais cronicamente infectados não tenham grande relevância na transmissão.

Achados de coinfecção por *Brucella* spp e morbilivírus também foram descritos (WEST et al., 2014; SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2019).

Os vírus podem ser transmitidos por aerossol e registros de vários autores informam que as infecções se estabelecem inicialmente no aparelho respiratório. O comportamento gregário e a alta densidade de cetáceos podem ocasionar a transmissão horizontal entre os animais (VAN BRESSEM, et al., 1999; KNIPE; HOWLEY, 2001; RAGA et al., 2008; VAN BRESSEM et al., 2014). Há evidências de que as fêmeas infectadas com CeMV possam transmitir a infecção pela via intrauterina e durante a lactação (DOMINGO et al., 1992; SHULMAN et al., 1997; FERNÁNDEZ et al., 2008; VAN BRESSEM et al., 2014).

Estudos sorológicos têm sido utilizados para a obtenção de dados sobre a epidemiologia da infecção por CeMV e para análise do perfil imunológico das populações antes e após uma epidemia e para prever futuras ocorrências de surtos (BALMER et al., 2018). A maioria dos estudos sorológicos foram baseados no teste de soroneutralização (BALMER et al., 2018), contudo, alguns ensaios imunoenzimáticos também foram desenvolvidos (SALIKI; LEHENBAUER, 2001).

Para o diagnóstico rápido da infecção por CeMV, testes moleculares baseados em PCR ou PCR em tempo real (RT-PCR) demonstraram ser de grande utilidade para a confirmação rápida da infecção. O sequenciamento dos genes codificadores da fosfoproteína, da proteína de fusão e da nucleoproteína tem possibilitado a diferenciação entre PMV e DMV e também a identificação de novas variantes virais (BARRETT et al., 1993; GROCH et al., 2014; BENTO et al., 2016). Métodos histopatológicos e imuno-histoquímicos vêm auxiliando no diagnóstico complementar da infecção e fornecendo importantes informações sobre sua patogênese (VAN BRESSEM et al., 2014; DÍAZ-DELGADO et al., 2019).

Um dos desafios no estudo das infecções pelos CeMV é a dificuldade em isolar e propagar o vírus em cultivo celular. O isolamento foi realizado com sucesso recentemente em células Vero expressando a molécula SLAM/CD150 (*Canine*

Signaling Lymphocyte Activation Molecule) (PELETTTO et al., 2018). No Brasil, até o momento, não há relatos de isolamento de morbillivirus de mamíferos aquáticos.

Não há tratamento eficaz contra a infecção por morbillivirus. O tratamento de animais acometidos que estiveram em programas de reabilitação consistiu em terapia de manutenção, no entanto, os espécimes vieram a óbito. (ECHEVERRI-ZULUAGA et al., 2015).

O Programa de Mamíferos Marinhos da Marinha dos EUA desenvolveu uma vacina recombinante contra DMV expressando a proteína de fusão (F) e a hemaglutinina (H). Nesse experimento inicial, golfinhos-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*) adultos, foram administradas três doses da vacina por via intramuscular, resultando no aumento dos títulos de anticorpos específicos contra o DMV (VAUGHAN et al., 2007). Porém, estudos ainda são necessários para utilização da vacina em larga escala.

3. JUSTIFICATIVA

Os mamíferos aquáticos são animais sentinelas, uma vez que possuem vida longa e estão no topo da cadeia alimentar, indicando a qualidade ambiental através da ocorrência de doenças infecciosas, destacando a importância dessas enfermidades em saúde pública (IBAMA, 2001).

O presente projeto atende aos Planos de Ação Nacional para a Conservação dos Mamíferos Aquáticos que ocorrem no Brasil, que possui entre as suas metas a de ampliação do conhecimento científico sobre os mamíferos aquáticos no país, incluindo ações de conservação como a avaliação do estado de saúde dos sirênios (*Trichechus inunguis* e *Trichechus manatus*) (LUNA et al., 2011), pequenos cetáceos como *Sotalia guianensis* (BARRETO et al., 2010) e grandes cetáceos como *Megaptera novaeangliae*.

A investigação da ocorrência de patógenos presentes em mamíferos aquáticos poderá fornecer subsídios para a avaliação do estado sanitário dos animais e para a adoção de medidas profiláticas para a conservação dessas espécies. Em razão do escasso conhecimento existente sobre este tema no Brasil, em especial nos sirênios, é necessária a realização de pesquisas contínuas para a avaliação das doenças que acometem os mamíferos aquáticos no país. Estudos direcionados para obtenção de dados desta natureza poderão ainda evitar a disseminação de zoonoses e demais doenças emergentes, garantindo reintroduções adequadas de animais em cativeiro à natureza, a fim de não comprometer a sanidade de populações de vida livre. Estas medidas poderão ser aplicadas tanto no procedimento de resgate quanto na reabilitação dos animais cativos.

4. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos investigar a ocorrência de infecções por *Brucella* spp. e *Morbillivirus* em:

- Peixes-boi-marinheiros (*Trichechus manatus manatus*) de cativeiro e de vida livre provenientes da região Nordeste do Brasil;
- Peixes-boi-da-amazônia (*Trichechus inunguis*) de cativeiro, provenientes da região Norte do Brasil;
- Cetáceos de vida livre provenientes da região Nordeste do Brasil

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho é parte integrante do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação sanitária de sirênios (*Trichechus manatus manatus* e *Trichechus inunguis*) brasileiros”, sob coordenação do Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e da Profa. Dra. Lara Borges Keid do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

O projeto de pesquisa possui licenças pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO (Licenças N°45568-1 e N°55433-1) e do Instituto de Proteção Ambiental do Amazonas – IPAAM (protocolos números 005/17 e 039/17), que podem ser visualizadas no Anexo 1 e 2, respectivamente e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) sob o protocolo número 6053030317.

5.1. ANIMAIS

No presente estudo foram avaliados animais vivos, tanto de vida livre como de cativeiro, bem como animais encontrados encalhados mortos. Também foram utilizadas amostras dos bancos de material biológico, de animais que vieram a óbito durante o período de cativeiro ou que foram encontrados encalhados mortos em programas de monitoramento de praias (PMPs). Foram analisados 161 indivíduos, sendo o total de 59 peixes-boi-marinhos (*T. manatus manatus*), 83 peixes-boi-da-amazônia (*T. inunguis*) e 23 cetáceos, representando as seguintes espécies: 16 botos-cinza (*S. guianensis*), uma baleia jubarte (*Megaptera novaeangliae*), dois golfinhos clímene (*S. clymene*), um golfinho-de-risso (*Grampus griseus*), um golfinho-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*), uma toninha ou franciscana (*Pontoporia blainvillei*) e um cachalote (*Physeter macrocephalus*).

Foram avaliados 48 peixes-boi-marinhos vivos, compreendendo animais nativos, mantidos em cativeiro e reintroduzidos. Os animais de cativeiro se encontram nos recintos de reabilitação pertencente ao Programa Peixe-Boi, executado principalmente em três unidades do Instituto Chico Mendes de Conservação da

Biodiversidade (ICMBio). O principal está localizado na Ilha de Itamaracá/Pernambuco, que entre 1980 e 2016 esteve sob a responsabilidade do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos (CMA) e atualmente se encontra sob os cuidados do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Marinha do Nordeste (CEPENE); outro na Área de Proteção Ambiental da Costa dos Corais (APACC), em Porto de Pedras, Alagoas; e o terceiro na Área de Proteção Ambiental Barra de Mamanguape (APA Mamanguape), no município de Mamanguape, Paraíba. Os animais reintroduzidos foram soltos em ambiente natural após reabilitação pelo ICMBio/CMA, ICMBio/CEPENE, APCC, APA Mamanguape e pela Fundação Mamíferos Aquáticos (FMA). Muitos destes animais foram amostrados em mais de uma ocasião, durante o período de reabilitação em cativeiro e após a reintrodução em ambiente natural. Animais nativos, pertencentes a população de Alagoas, foram avaliados.

Também foram analisados 11 peixes-boi-marinhos que vieram a óbito, sendo quatro animais de cativeiro, provenientes do ICMBio/CMA, dos quais dois já haviam sido previamente amostrados em vida, durante seus manejos em cativeiro. Os demais animais foram indivíduos de vida livre, encontrados encalhados em praias e amostrados durante atividades de monitoramento realizadas pelo ICMBio/CMA.

As amostras de todos os 83 peixes-boi-da-Amazônia foram provenientes de animais que foram resgatados e levados a cativeiros: 26 do Jardim Zoológico-Faculdades Integradas do Tapajós (ZOOFIT) em Santarém, Pará e 57 do Centro de Preservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos (CPPMA) localizado na usina hidrelétrica de Balbina, em Presidente Figueiredo, Amazonas. Os animais mantidos pelo ZOOFIT foram amostrados uma única vez, enquanto os mantidos ao CPPMA, foram amostrados entre 1 e 10 vezes, contemplando amostras provenientes de manejos anteriores, de animais que vieram a óbito na instituição (n=16) e de manejos realizados durante o desenvolvimento deste estudo. Dois dos animais que vieram a óbito haviam sido previamente amostrados em vida, durante o manejo em cativeiro.

As amostras dos 23 cetáceos analisados foram provenientes de animais encontrados encalhados mortos durante os monitoramentos de praias realizados pelo ICMBio/CMA e pela FMA nas suas áreas de atuação na Rede de Encalhe e Informação de Mamíferos Aquáticos do Brasil (REMAB), quando estas instituições procedem com manejo e coleta de amostras dos animais atendidos.

Informações referentes à origem, data de amostragens e amostras obtidas dos animais podem ser visualizadas nos Anexos 3 (animais que vieram a óbito) e 4 (animais vivos).

A captura e marcação de peixe-boi-marinho (*Trichechus manatus*) em vida livre no Brasil vem sendo realizada pelo ICMBio e instituições parceiras para o estudo da saúde e uso de área destes animais, assim como do habitat em que estão inseridos.

Nessa atividade é utilizada uma embarcação construída especificamente para captura da espécie, de forma que permita o trabalho e garanta a saúde e bem-estar do animal e da equipe. Os manejos foram realizados na praia e quando as condições não permitiram, dentro da própria embarcação.

Para a atividade foi confeccionada uma rede específica, para capturar os animais sem causar nenhum tipo de dano físico aos mesmos. A rede foi confeccionada pela Cooperativa de Profissionais em Serviços Náuticos, Monitoramento, Educação e Turismo Ambiental, sediada em Tamandaré, Pernambuco e acompanhada pela equipe do ICMBio/CMA. Foram confeccionadas três redes em tamanhos distintos, de 200 m x 7 m, 140 m x 7 m e 60 m x 7 m, em virtude de possíveis necessidades operacionais distintas. Foi utilizada malha de 80 mm, multifilamento, em *nylon* seda, fio torcido 210/36. As redes foram entalhadas com boias de metro em metro e utilizando correntes galvanizadas 3/16, como tralha de chumbo, para garantir que a rede permanecesse assentada no fundo, em qualquer condição.

Além das embarcações atuando por água, a captura conta com equipes em terra, munidas de binóculos e rádio comunicadores. Estas equipes têm a função de passar informações sobre a localização dos peixes-boi em relação às embarcações.

A equipe atuante nos barcos de apoio e de captura é responsável pelos procedimentos de cerco e lançamento da rede, pela captura e manejo dos peixes-boi, pelos procedimentos veterinários e de coleta de material biológico, pela coleta de medidas corporais, pela marcação dos animais e soltura dos animais depois de finalizados os procedimentos.

Os animais são 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 deve ser realizada no menor tempo possível, para evitar estresse ao animal.

De acordo com ATTADAMO (2014), para garantir o bem-estar do peixe-boi, o grau de estresse é monitorado durante toda a atividade, de acordo com planilha

elaborada pelo Dr. Robert K. Bonde (comunicação pessoal), com adaptações. Para a decisão sobre a continuidade ou interrupção do procedimento, o animal deve ser avaliado e pontuado em relação ao reflexo, atividade, frequência cardíaca, temperatura e a frequência respiratória. Quanto ao reflexo é considerada a reação do animal quanto ao toque no corpo durante o manejo, reflexo palpebral e toque na nadadeira peitoral. A pontuação varia com números inteiros de zero a dois (0-2), sendo zero (0) quando inexistente, um (1) quando existente, mas fora do ideal e dois (2) quando existente e dentro dos padrões de normalidade. Este monitoramento deve ser realizado a cada 10 minutos, podendo ocorrer em tempo menor, caso seja verificado que o animal apresente alteração significativa em um dos parâmetros durante o intervalo das análises. Se for constatado que a soma do resultado esteja acima de 8, a atividade é mantida sem restrições; com valores entre cinco e sete, o animal é molhado e observado com mais intensidade, no entanto interrompida a colheita de amostras de sangue e *swabs*; para valores entre um e quatro, a atividade deve ser imediatamente interrompida e o animal deve retornar ao ambiente em que foi retirado (Quadro 1).

Quadro 1. Valores de avaliação de estresse dos peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) manejados, com pontuações baseadas nos sinais vitais. Fonte: ATTADEMO, 2014.

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)	(_____)	8-10 – Muito bom – manter a atividade; 5-7 – Regular – Atenção no animal; 1-4 – Crítico – reintroduzir o animal imediatamente; 0 – Óbito.

As colheitas dos materiais biológicos foram realizadas em conjunto com médicos veterinários do ICMBio/CMA e parceiros, de acordo com o protocolo de manejo estabelecido pelo ICMBio/CMA. 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*, a fim de evitar contaminação entre as amostras.

No caso dos animais de cativeiro, a imobilização dos animais foi realizada da seguinte maneira: primeiramente foi realizada a drenagem de toda a água dos tanques onde os animais são mantidos e em seguida os mesmos foram colocados numa superfície macia (espuma de densidade D-33 medindo 2,5 m de comprimento, 1 m de largura e 10 a 15 cm de espessura). As características antiderrapantes da espuma e o peso do animal atuam como uma forma de contenção. Os animais devem ser mantidos umedecidos durante todo o tempo em que permanecem fora d'água.

No caso dos animais que vieram a óbito, seja em cativeiro ou de vida livre, foi realizada a necropsia completa, utilizando-se métodos padronizados para mamíferos aquáticos (GERACI; LOUNSBURY, 2005). Foram amostrados, preferencialmente, animais mortos que apresentassem carcaças em estágios de decomposição 2 (COD-2), que indica animal recém-morto e 3 (COD-3), que indica carcaça em decomposição, mas com órgãos intactos.

Nos locais em que foram coletadas as amostras, foi possível a centrifugação do sangue para separar o soro. Os materiais foram armazenados em caixas térmicas contendo gelo seco e/ou barras de gelo em gel e transportadas por via terrestre e aérea para o Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e para o Laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, ambos localizados no campus Fernando Costa, em Pirassununga, SP, onde foram processados.

5.2. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Em carcaças de animais encalhados mortos foi realizada, durante a necropsia, a coleta de fragmentos de órgãos para a realização de análises laboratoriais, microbiológicas e moleculares. Fragmentos dos seguintes órgãos foram coletados:

baço, cérebro, coração, fígado, glândula mamária, intestino, linfonodos, órgãos reprodutivos, pâncreas, pulmão e rins. De cada órgão, foi coletado um fragmento de aproximadamente 2 x 2 x 2 cm para os exames microbiológicos e moleculares destinados à pesquisa direta de patógenos nas amostras, utilizando material estéril, dando preferência para fragmentos internos ou que apresentaram lesões visíveis durante a necropsia.

O material coletado foi acondicionado em saco de plástico estéril, vedado e identificado, mantido congelado (-20° C) até a realização das análises laboratoriais. Quando não foi possível o congelamento das amostras, os tecidos foram armazenados em etanol 70%, em temperatura ambiente.

Em animais vivos foram coletadas amostras de *swabs* para a realização de exames microbiológicos e moleculares. Foram coletadas amostras em duplicata, utilizando *swabs* estéreis lacrados, sendo uma das amostras acondicionadas em tubos sem conservantes e outra em tubos contendo meio de transporte (meio de Stuart). De cada animal, foram coletados *swabs* anais, genitais, nasais, orais, oculares e de eventuais lesões cutâneas apresentadas pelos mesmos, conforme a disponibilidade, para diagnóstico de infecções por *Brucella* e *Morbillivirus*. As amostras foram mantidas congeladas a -80° C até a realização das análises laboratoriais.

Amostras de sangue dos sirênios foram coletadas direto do plexo sanguíneo braquial utilizando material estéril. As amostras foram acondicionadas em tubos estéreis a vácuo contendo citrato de sódio como anticoagulante para exames moleculares e em tubos sem aditivo para obtenção de soro sanguíneo para testes sorológicos. As amostras obtidas de cada animal podem ser visualizadas nos Anexos 3 e 4.

5.3. EXAMES LABORATORIAIS

5.3.1. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE BRUCELOSE

O diagnóstico sorológico da brucelose foi realizado utilizando-se o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) (LAGE et al., 2006) empregando-se antígeno produzido pelo Instituto Biológico de São Paulo, conforme as instruções do fabricante. Anteriormente à realização do teste, o antígeno e o soro foram equilibrados em

temperatura ambiente. O teste foi realizado misturando-se 30 µL de antígeno a 30 µL de cada soro teste, em placa de vidro quadriculada. As amostras foram então homogeneizadas com bastão de vidro e a leitura foi realizada após 4 minutos, sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram formação de grumos, os quais são indicativos de reação de aglutinação. Foram consideradas negativas as amostras em que não foi verificada a formação de grumos.

5.3.2. EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE SWABS

As amostras de *swabs* foram descongeladas e ressuspendidas em solução de cloreto de sódio a 0,9 %. Após homogeneização em vórtex, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração de DNA descrito no Anexo 5, baseado em lise enzimática e purificação com solventes orgânicos (fenol/clorofórmio), adaptado de SAMBROOK e RUSSEL (2001).

5.3.3. EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue colhidas em frasco contendo citrato de sódio ou EDTA como anticoagulante foram descongeladas e, previamente à extração de DNA, foram submetidas ao procedimento de lavagem para remoção da hemoglobina. Um volume de 1.000 µL (ou o volume de sangue disponível) foi transferido para um microtubo e acrescido de 500 µL de tampão TE (Tris-EDTA, 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). Após homogeneização em vórtex, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão. O sedimento obtido foi ressuspendido em tampão TE até completar o volume de 1 mL e, em seguida, homogeneizado em vórtex. O procedimento de centrifugação, descarte do sobrenadante e ressuspensão do sedimento em tampão TE foi repetido até que o sedimento e o sobrenadante apresentassem coloração clara, indicando a redução da quantidade de hemoglobina. Após a última etapa de lavagem, o sedimento obtido foi utilizado no procedimento de extração de DNA, empregando-se o protocolo descrito para lise de tecidos do *DNeasy Blood and Tissue kit* (Qiagen). O DNA obtido foi eluído num volume de 50 µl com o tampão AE.

5.3.4. EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE TECIDOS

As amostras de tecidos obtidas e acondicionadas congeladas, foram descongeladas e maceradas utilizando cadinho e pistilo estéreis, obtendo-se uma suspensão 1:3 (p/v) em solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9 %, estéril. As amostras de tecidos obtidas e preservadas em etanol 70% foram removidas da solução de etanol e imersas em solução de NaCl a 0,9 % estéril, *overnight*. A solução de NaCl foi trocada duas vezes e em seguida, as amostras foram maceradas de maneira a obter uma suspensão 1:3, preparada conforme descrito para as amostras mantidas congeladas.

De cada suspensão de tecidos, um volume de 100 µL, foi submetido à extração de DNA utilizando o protocolo para lise de tecidos do kit *DNeasy Blood and Tissue kit* (Qiagen). O procedimento de eluição foi realizado num volume de 50 µl do tampão AE.

5.3.5. EXTRAÇÃO DE RNA DAS AMOSTRAS DE TECIDOS E DE SWABS NASAIS

As suspensões de tecidos, obtidas conforme descrito no item 4.3.4, foram utilizadas para a extração de RNA, assim como as amostras de *swabs* nasais ressuspensas em solução de NaCl a 0,9% estéril, conforme descrito no item 4.3.2. Um volume de 250 µL de cada amostra foi utilizado para a extração de RNA, conduzida conforme o protocolo descrito pelo fabricante do reagente TRIzol-LS® (Ambion) (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). O RNA extraído foi ressuspendido em um volume de 20 µL da solução de *RNA Ressuspension Solution* (Invitrogen) e acondicionado em temperatura de -80° C, até a realização da reação de transcrição reversa.

5.3.6. REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA PARA OBTENÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR (DNAC)

As amostras de RNA extraídas foram primeiramente submetidas à reação de transcrição reversa (RT-PCR) para obtenção do DNAC. A reação foi realizada utilizando-se *primers* randômicos.

Para a reação de transcrição reversa, um volume de 10,2 µL de RNA extraído foi adicionado ao tampão de reação contendo 1 µL da mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a 10 mM e 0,8 µL de *random primers* a 3 µg/µL, sendo a mistura incubada em termociclador durante 5 minutos a 65°C. Após a incubação, as amostras foram acondicionadas imediatamente em gelo, sendo adicionados 4 µL do tampão *First-Strand Buffer* (5X), 2 µL de ditionitrito (DTT) a 0,1 M e 2 µL de *RNAse out* a 40 unidades/µL. Após incubação em termociclador durante 2 minutos a 37°C, as amostras foram acondicionadas em gelo e o volume de 1 µL de da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen) a 200 U/µL foi adicionado. As amostras foram incubadas em termociclador no seguinte ciclo: 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 50 minutos e 70°C durante 15 minutos. Após a RT-PCR as amostras de DNAc foram mantidas a -80°C até a reação de PCR.

5.3.7. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA A DETECÇÃO DE *BRUCELLA*

Os *primers* direcionados à sequência de inserção 711 (IS711) de *Brucella*, denominados IS711-517F22 e IS711-755-R24 foram utilizados para a detecção de DNA de *Brucella* spp., amplificando um fragmento de 262 pares de base (pb) (BATINGA *et al.*, 2018) na reação de PCR denominada PCR-IS711.

As reações de amplificação foram realizadas num volume de 50 µL, contendo 5 µL de 10x PCR Buffer (KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; pH 9,0), 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM, 1 µL da mistura de dNTPs a 10 mM, 3 µL de cada *primer* a 10 pmol/µL, 0,3 µL de *Platinum Taq DNA Polimerase* a 5 U/µL (Invitrogen), 31,2 µL de água ultrapura e 5 µL de DNA.

As amplificações foram realizadas em placa de 96 poços, em termociclador Veriti (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 94°C durante 2 minutos para a desnaturação inicial, seguida por 40 ciclos de 94°C durante 40 segundos (desnaturação), 59°C durante 40 segundos (*annealing*) e 72°C durante 40 segundos (extensão). A extensão final foi realizada a 72°C durante 10 minutos (BATINGA *et al.*, 2018).

As amostras que apresentaram resultado positivo na PCR-IS711 foram submetidas à uma segunda reação de amplificação, empregando-se os *primers* B4 e

B5, direcionados ao gene BCSP31, que codifica uma proteína de 31 kDa de *Brucella* spp. (BAILY et al., 1992).

As reações de amplificação foram realizadas em *nested*, sendo que a primeira reação foi realizada num volume de 25 µL, contendo 2,5 µL de 10x PCR Buffer (KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; pH 9,0), 0,75 µL de MgCl₂ a 50 mM, 0,5 µL da mistura de dNTPs a 10 mM, 1,5 µL de cada *primer* a 10 pmol/µL, 0,15 µL de *Platinum Taq DNA Polimerase* a 5 U/µL (Invitrogen), 15,6 µL de água ultrapura e 2,5 µL de DNA. A segunda reação foi realizada nas mesmas condições da primeira, utilizando-se o mesmo par de *primers*, porém num volume final de 50 µL e utilizando-se 5 µL do DNA amplificado na primeira reação.

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems), nas seguintes condições de amplificação: 94° C durante 2 minutos para que ocorresse a desnaturação inicial; em seguida, 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos para desnaturação, 60° C durante 30 segundos para *annealing* e 72° C durante 30 segundos para extensão. Em seguida, extensão final foi realizada a 72° C durante 10 minutos.

A cada amplificação foram incluídos uma amostra controle negativo, composta por água ultrapura e uma amostra controle positivo de amplificação, composta por 5 µL de DNA extraído da cepa de referência RM6/66 de *B. canis*.

As amostras que apresentaram resultado positivo nas duas reações gênero-específicas para *Brucella* (PCR-IS711 e PCR-BCSP31) foram submetidas às reações de *nested*-PCR utilizando-se *primers* direcionados aos genes *omp25* (PCR-omp25) e *trpE* (PCR-trpE) que codificam, respectivamente, as proteínas antranilato sintase e a proteína de membrana externa de 25kDa de *Brucella* spp, para identificação da espécie de *Brucella* (WHATMORE et al.,2007).

As reações de amplificação foram realizadas num volume de 50 µL, contendo 5 µL de 10x PCR Buffer (KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; pH 9,0), 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM, 1 µL da mistura de dNTPs a 10 mM, 2,5 µL de cada *primer* a 10 pmol/µL, 0,3 µL de *Platinum Taq DNA Polimerase* a 5 U/µL (Invitrogen), 32,2 µL de água ultrapura e 5 µL de DNA. A segunda reação foi realizada nas mesmas condições da primeira, num volume final de 50 µL e utilizando-se 5 µL do DNA amplificado na primeira reação e os mesmos pares de *primers* da primeira reação.

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems), com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial à 94°

C durante 2 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, *annealing* a 60°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. Em seguida, foi realizada extensão final a 72°C durante 10 minutos.

5.3.8. REAÇÃO DE *NESTED*-PCR PARA A DETECÇÃO DE PARAMIXOVÍRUS

Para a detecção de paramixovírus foi utilizada a reação de *nested*-PCR, empregando-se *primers* degenerados, direcionados à RNA polimerase viral, para amplificação de componentes da subfamília Paramyxovirinae, descritos por TONG *et al.* (2008), capazes de amplificar um fragmento de aproximadamente 500 pb (PCR-RNApol).

A reação de amplificação com os *primers* externos PAR-F1 e PAR-R foi realizada no volume final de 25 µL, consistindo de: 4 µL de DNAc obtido das amostras alvos, 2,5 µL de 10x PCR Buffer (KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; pH 9,0), 1 µL de MgCl₂ a 50 mM, 0,5 µL da mistura de dNTPs a 10 mM, 0,35 µL de cada *primer* a 10 pmol/µL, 0,2 µL de *Platinum Taq DNA Polimerase* a 5 U/µL (Invitrogen) e 16,1 µL de água ultrapura.

A cada amplificação foram incluídos uma amostra controle negativo, composta por água ultrapura e uma amostra controle positivo de amplificação, composta por cDNA extraído da vacina tríplice viral, que contém o vírus do sarampo vivo atenuado, cepa Schwarz, (Biomanguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro), gentilmente cedida pelo Grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE) de Piracicaba, São Paulo, para garantir a qualidade dos reagentes utilizados no procedimento de amplificação.

As condições de amplificação para cada reação foram as seguintes: 95°C durante 2 minutos para a desnaturação inicial; 35 ciclos consistindo de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, *annealing* a 46°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos; extensão final a 72°C durante 10 minutos.

A reação de semi *nested*-PCR com os *primers* internos PAR-F2 e PAR-R foi realizada num volume final de 25 µL, utilizando-se 2 µL da amostra previamente amplificada na reação de PCR, 2,5 µL de 10x PCR Buffer (KCl 50mM; Tris HCl 10mM; pH 9,0), 1 µL de MgCl₂ a 50mM, 0,5 µL da mistura de dNTPs a 10 mM), 1 µL de cada *primer* a 10 pmol/µL, 0,2 µL de *Platinum Taq DNA Polimerase* a 5 U/µl (Invitrogen) e

16,8 µL de água ultrapura. O ciclo de amplificação da semi *nested*-PCR foi o mesmo utilizado na PCR.

As sequências dos *primers* utilizados podem ser verificadas no Quadro 2.

Quadro 2. Nomenclatura, sequência, região alvo e referência bibliográfica dos primers utilizados para detecção direta de *Brucella* spp. e *Morbillivirus* em amostras biológicas de mamíferos aquáticos.

Patógeno e região alvo dos <i>primers</i>	Nome do <i>primer</i>	Sequência (5' → 3')	Referência
Sequência de inserção 711 (IS711) de <i>Brucella</i> spp.	IS711-517F22	TGTCCGCAAGCTTCAAGCCTTC	BATINGA et al. (2018)
	IS711-755R24	CGGTCAATGTTTTCTCGCATCGC A	
Gene <i>bcs</i> p31, codificador de proteína de 31 kDa de <i>Brucella</i> spp.	B4	ACATAGATCGCAGGCCAGTCA	BAILY et al. (1992)
	B5	AGATACCGACGCAAACGCTAC	
Gene codificador da antranilato sintase de <i>Brucella</i> spp.	trpE-F	GCGCGCMTGGTATGGCG	WHATMORE et al. (2007)
	trpE-R	CKCSCCGCCATAGGCTTC	
Gene codificador da proteína de membrana externa de 25 kDa de <i>Brucella</i> spp.	omp25-F	ATGCGCACTCTTAAGTCTC	
	omp25-R	GCCSAGGATGTTGTCCGT	
Gene codificador da RNA polimerase viral dos vírus pertencentes à subfamília Paramyxovirinae	PAR-F1	GAAGGITATTGTCAIAARNTNTGG AC	TONG et al. (2008)
	PAR-F2	GTTGCTTCAATGGTTCARGGNGA YAA	
	PAR-R	GCTGAAGTTACIGGITCICCDATRT TNC	

5.3.9. VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Os produtos amplificados na PCR foram visualizados por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) utilizando-se em cuba horizontal e tampão de corrida TBE 1X (0,045 M Tris-borato e 1 mM EDTA, pH 8,0), sob voltagem constante de 6-7 V/cm. Após o procedimento de eletroforese, o gel foi imerso numa solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) durante 1 hora para coloração e a visualização dos produtos amplificados foi realizada em transiluminador ultravioleta (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A avaliação dos produtos amplificados foi feita por meio da comparação com padrão de peso molecular contendo fragmentos múltiplos de 100 pb.

5.3.10. SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

Todas as amostras que apresentaram resultados positivos na PCR-trpE e na PCR-omp25, utilizadas para amplificação de *Brucella*, bem como na detecção de paramixovírus tiveram os produtos amplificados cortados do gel com lâminas de bisturi e em seguida purificados utilizando-se o *kit* Illustra, GFX PCR DNA and GEL Band Purification Kit (GE Healthcare), conforme as indicações do fabricante.

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando-se o *kit* ABI PRISM BigDye® Terminator v3.1 (Ready Reaction Cycle Sequencing, Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados para o sequenciamento os mesmos *primers* empregados nas reações de PCR. Após a reação de sequenciamento, a separação dos produtos sequenciados foi realizada em sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

As sequências obtidas foram analisadas utilizando-se o programa Codon Code Aligner v.4.2.1 (Codon Code Corp. Dedham, USA) para obtenção da sequência consenso, as quais foram alinhadas, utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999), com sequências homólogas obtidas por meio do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1997) no sítio www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.

Uma vez selecionadas as sequências homólogas, foi realizada a reconstrução filogenética com inferência pelo método de Máxima Verossimilhança com base em

modelo de substituição de nucleotídeo de Kimura de dois parâmetros, calculando a porcentagem de réplicas nas quais os táxons foram agrupados por cada *cluster* usando o teste de *bootstrap* (um total de 1000 réplicas), utilizando-se o programa MEGA X (<http://megasoftware.net/>).

5.3.11. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE BRUCELOSE

O cultivo microbiológico para isolamento de *Brucella* spp. foi realizado apenas nas amostras de tecidos que apresentaram resultado positivo na PCR.

Para o procedimento, as suspensões de tecidos foram inoculadas, no volume de 100 µL, em triplicata, em placas contendo os seguintes meios: (i) ágar Triptose (DIFCO®) com 5% de soro fetal bovino (SFB); (ii) ágar triptose com 5% de SFB e os antibióticos sulfato de polimixina B (5000 UI/L), bacitracina (25.000 IU/L), ácido nalidíxico (5 mg/L), nistatina (100.000 IU/L), vancomicina (20 mg/L) e cicloheximida (30 mg/L), correspondendo à formulação do meio de Farrell (OIE, 2016); (iii) ágar triptose com 5% de SFB e os antibióticos metanosulfonato de colistina (7.5 mg/L), vancomicina (3 mg/L), nitrofurantoina (10 mg/L), nistatina (100.000 IU/L) e anfotericina B (2.5 mg/L), correspondendo à formulação do meio de Thayer-Martin modificado (OIE, 2016). As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera com 10% de CO₂ durante 30 dias. A cada quatro dias foi realizada a verificação de crescimento bacteriano nas placas.

Além disso, uma quarta alíquota da suspensão de tecidos foi inoculada em caldo triptose, acrescido de 5% de SFB e dos antibióticos sulfato de polimixina B (5000 UI/L), bacitracina (25.000 IU/L), ácido nalidíxico (5 mg/L), nistatina (100.000 IU/L), vancomicina (20 mg/L) e cicloheximida (30 mg/L), correspondendo ao meio de Farrell (OIE, 2016). As amostras foram incubadas a 37 °C em atmosfera com 10% de CO₂ durante 30 dias. Foram realizados subcultivos em ágar triptose acrescido de 5% de SFB a cada quatro dias para verificação de crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 37° C, em atmosfera com 10% de CO₂, durante cinco dias.

As colônias bacterianas isoladas foram identificadas por meio de características morfológicas e moleculares para a identificação do gênero e espécie de *Brucella* (ALTON et al., 1976; BATINGA et al., 2018).

6. RESULTADOS

6.1. RESULTADOS DA INVESTIGAÇÃO DE BRUCELOSE NOS SIRÊNIOS

Todos os sirênios analisados apresentaram resultado negativo no teste do AAT para sorodiagnóstico de brucelose, bem como nas reações moleculares para detecção de DNA de *Brucella* em amostras de *swabs* e sangue.

Dentre os sirênios submetidos à necropsia, um animal da espécie *T. manatus manatus*, que veio a óbito em cativeiro, proveniente do ICMBio/CMA, apresentou resultado positivo na PCR-IS711 aplicada em amostra de fígado. Contudo, a amostra apresentou resultado negativo pela PCR-BCSP31, sendo o animal, portanto, considerado não infectado.

Ainda, um animal da espécie *T. inunguis*, proveniente de cativeiro no CPPMA, apresentou resultado positivo na PCR-IS711 em amostra de cérebro. A amostra, porém, não apresentou amplificação do produto de tamanho esperado na PCR-BCSP31, mas sim amplificação de fragmento superior a 1000 pb, sendo o resultado considerado negativo para *Brucella*.

6.2. RESULTADOS DA INVESTIGAÇÃO DE BRUCELOSE NOS CETÁCEOS

Dentre os cetáceos analisados, um espécime de boto-cinza (*S. guianensis*) apresentou resultado positivo na PCR-IS711 e na PCR-BCSP31 em amostra de rim, com amplificação de fragmentos de 262 pb (Figura 1) e 223 pb, respectivamente, os quais são indicativos de infecção por *Brucella* spp.

De acordo com o resultado do sequenciamento parcial dos genes *omp25* e *trpE*, a amostra apresentou 100% de similaridade nestes *loci* com a amostra de *Brucella* previamente detectada em um espécime de *Stenella clymene* no litoral de Alagoas, Brasil (número de acesso do GenBank: KY657245 e KY657246, respectivamente) (ATTADEMO et al., 2018), indicando, portanto, tratar-se de infecção por *B. ceti*.

O cultivo microbiológico foi conduzido na amostra de rim positiva na reação molecular, porém não houve isolamento de *Brucella* em nenhum dos meios de cultivo utilizados.

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio para visualização de produtos amplificados na reação em cadeia da polimerase para detecção de *Brucella spp* em amostras de fragmentos de órgãos de mamíferos aquáticos, utilizando *primers* que têm como alvo a sequência de inserção IS711 (PCR-IS711). Legenda. 1: Controle positivo de amplificação (DNA da cepa RM6/66 de *Brucella canis*) com resultado positivo (amplificação de fragmento de 262 pb); 2-4: controle negativo; 5-12: amostras de tecidos de mamíferos aquáticos com resultados negativos; 13: amostra de rim de *Sotalia guianensis* com resultado positivo; 14: padrão de peso molecular de 100 bp.

O boto-cinza (*S. guianensis*) que apresentou resultado positivo era macho e foi resgatado morto no dia 7 de dezembro de 2005, na Praia de Bairro Novo, em Olinda, no Estado de Pernambuco, Brasil (Latitude: 08°01'43,79"S/ Longitude: 034°51'34,20"W). A carcaça apresentava comprimento total de 179,5 centímetros e estado de decomposição 2 (GERACI; LOUNSBURY, 2005) (Figura 2A).

Durante o exame externo do animal, foram verificadas marcas de redes de pesca (Figura 2A-B). Na necropsia foram verificados pulmões enfisematosos com a presença de espuma nos brônquios e bronquíolos (Figura 2C) e cistos crepitantes, sugerindo morte por afogamento em rede. No estômago anterior verificou-se a presença de peixes em processo de digestão (Figura 2D) e parasitos nematoides medindo aproximadamente cinco centímetros. Nos demais órgãos, não foram verificadas alterações macroscópicas.

Figura 2. Achados macroscópicos verificados em espécime de boto-cinza (*Sotalia guianensis*) com resultado positivo para *Brucella* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A, B: marcas de rede de pesca; C) espuma em brônquios e bronquíolos; D) presença de peixe no estômago anterior em processo de digestão.

6.3. RESULTADOS DA INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR PARAMIXOVÍRUS NOS SIRÊNIOS

Todos os sirênios analisados apresentaram resultado negativo na reação de nPCR para detecção de paramixovírus nas amostras de tecidos e *swabs* nasais testadas, indicando ausência de infecção viral.

6.4. RESULTADOS DA INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR PARAMYXOVÍRUS NOS CETÁCEOS

Dos 19 cetáceos analisados quanto à infecção por paramixovírus, um boto-cinza (*S. guianensis*), fêmea, resultou positivo em amostras de rim e fígado na *nested*-PCR para detecção de paramixovírus. Trata-se de um animal resgatado no dia 13 de março de 2010 na Barra do Santo Antônio, no Estado de Alagoas, juntamente com outro macho da mesma espécie. A necropsia foi realizada no dia 14 de março de 2010. A carcaça apresentava COD-3, comprimento total de 180 centímetros e peso estimado em 60 kg. Os achados macroscópicos do animal foram os seguintes: rins de coloração vermelho-enegrecido, fígado de coloração esverdeada e de consistência firme, ausência de parasitos, estômago parcialmente cheio. A suspeita da morte do golfinho foi afogamento devido ao emalhe em rede de pesca. Amostras fixadas em formol não estavam disponíveis para realização de exame histopatológico.

Os produtos amplificados das amostras positivas foram submetidos ao sequenciamento e as sequências geradas apresentaram identidade variando entre 74% e 76,49% em relação a outros 18 *Morbillivirus* de cetáceos, cujas sequências do gene codificador da RNA polimerase viral estavam disponíveis (números de acesso no GenBank: MH430932-MH430940, MH430941, MH430942, MH430944, MH430945, MF589987, AJ608288, KU720623-KU720625), incluindo amostras provenientes de várias espécies de cetáceos na Alemanha, Reino Unido e EUA. Já a identidade em relação a outras espécies de morbilivírus variou entre 75,85% e 70,58%, indicando tratar-se de infecção por uma variante viral diferente. A análise filogenética da sequência obtida indica que o vírus detectado corresponde a uma linhagem distinta dos demais morbilivírus detectados (Figura 3), contudo, sequências deste fragmento do gene codificador da RNA polimerase viral de GDMV não foram incluídas na análise, por não estarem disponíveis.

Figura 3. Análise filogenética de *Morbillivirus* detectado em *Sotalia guianensis* no Brasil, utilizando-se sequências parciais do gene codificador da RNA polimerase viral. A história evolutiva foi inferida empregando-se o método da máxima verossimilhança com base em modelo de substituição de nucleotídeo de Kimura de 2 parâmetros. (●): Sequência obtida neste estudo. As análises evolutivas foram conduzidas no programa MEGA X.

7. DISCUSSÃO

Até o momento, não foram descritas infecções por *Brucella* spp. em sirênios, contudo, poucas pesquisas foram conduzidas na tentativa de investigar a ocorrência de brucelose nesta ordem de mamíferos aquáticos. Num estudo sorológico prévio, conduzido no Brasil, em animais da espécie *T. manatus manatus* provenientes de um dos centros amostrados no presente trabalho (ICMBio/CMA), porém em período anterior, verificou-se que seis de 58 animais (10,4%) analisados apresentaram reação positiva no teste do AAT. Contudo, os resultados não foram confirmados por meio do teste de fixação de complemento, que foi empregado como teste confirmatório (ATTADAMO, 2014). Por ocasião daquele estudo, não foram realizados testes laboratoriais diretos na tentativa de confirmar os resultados sorológicos obtidos.

Numa abordagem mais recente, SANCHÉZ-SARMIENTO et al. (2018) avaliaram sorologicamente 21 *T. manatus manatus*, sendo 17 animais de cativeiro, provenientes de dois centros de reabilitação localizados nos Estados do Ceará e Rio

Grande do Norte e quatro animais de vida livre, encontrados encalhados na costa do Ceará por meio dos teste sorológicos do AAT e por um ensaio imunoenzimático competitivo (ELISAc) comercial, não sendo verificadas reações positivas em nenhum dos animais avaliados.

Testes sorológicos vêm sendo empregados para a investigação de infecções por *Brucella* em uma ampla variedade de espécies de mamíferos aquáticos (JEPSON et al., 1997; OHISHI et al., 2003; SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2018). A *B. ceti* é antigenicamente semelhante a *B. abortus* e *B. melitensis*, por apresentar os mesmos antígenos de superfície que são usualmente utilizados para a análise sorológica da brucelose em bovinos com infecção (GONZÁLEZ-BARRIENTOS et al., 2010). Assim, a maioria dos estudos realizados basearam-se em testes padronizados para o diagnóstico da infecção em animais domésticos, em razão da dificuldade de se padronizar e validar ensaios sorológicos para serem aplicados em mamíferos aquáticos (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2018). O emprego de ensaios sorológicos padronizados em espécies domésticas para o diagnóstico da infecção em espécies silvestres pode acarretar resultados falso-positivos e falso-negativos (EL-SAYED; AWAD, 2018), uma vez que a infecção pode apresentar dinâmica distinta, dificultando, muitas vezes, a interpretação dos resultados obtidos (GILBERT et al., 2013). Estudos para avaliação da dinâmica da resposta humoral foram conduzidos em golfinhos-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*) naturalmente infectados por *Brucella* nos EUA e indicaram que os títulos de anticorpos podem sofrer flutuação ao longo da infecção e mesmo declinar, atingindo níveis não detectáveis, o que pode dificultar o diagnóstico em animais cronicamente acometidos (MEEGAN et al., 2012).

As amostras mais promissoras para a detecção de *Brucella* são tecidos e lesões encontradas em animais mortos devido a amostragem de órgãos potencialmente infectados, sendo muitas vezes difícil a detecção da infecção em animais vivos (MEEGAN et al., 2012; WU et al., 2016). Assim, no presente estudo, a investigação da ocorrência de infecção por *Brucella* foi baseada na aplicação de testes sorológicos paralelamente a testes moleculares em várias amostras biológicas, na tentativa de ampliar as chances de detecção da infecção, caso a mesma estivesse presente, com a análise de peixes-boi-da-Amazônia cativos de dois diferentes centros e de peixes-boi-marinhos de cativeiro e reintroduzidos.

Nos animais amostrados vivos, a PCR foi conduzida principalmente em amostras de *swabs* genitais e nasais. *Swabs* genitais foram utilizados devido à já

conhecida associação da infecção com quadros clínicos reprodutivos, principalmente casos de abortamentos, ocorrência de natimortos e infertilidade (GUAZMÁN-VERRI et al., 2012).

Uma vez que nos cetáceos acometidos por *Brucella*, manifestações clínicas não reprodutivas também são frequentemente relatadas (GUAZMÁN-VERRI et al., 2012), outras amostras biológicas, também foram utilizadas, na tentativa de aumentar as chances de detecção da infecção em sirênios, caso a infecção esteja presente. Portanto, no presente estudo, além das amostras de *swabs* genitais, também foram empregadas amostras de *swabs* nasais.

Resultados de um estudo previamente conduzido em cetáceos, no qual a PCR em tempo real de *swabs* coletados de orifícios respiratórios foi comparada com a PCR em tempo real de fragmentos de pulmão, indicaram uma sensibilidade do teste molecular aplicado aos *swabs* respiratórios de 94% (17/18) em relação à PCR aplicada em amostras de pulmão. A especificidade do teste foi de 100% (63/63) (WU et al., 2016), sendo este considerado um teste não invasivo para detecção rápida de *Brucella spp.* no trato respiratório dos golfinhos. De alguns animais, também, foram utilizadas amostras de *swabs* orais, oculares e anais, quando disponíveis, bem como amostras de sangue.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os resultados obtidos em estudos anteriores (ATTADEMO, 2014; SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2018), não tendo demonstrado evidências de infecção por *Brucella spp.* em sirênios brasileiros.

Nos cetáceos, a brucelose vem sendo descrita em várias localidades geográficas, sendo evidenciada tanto por métodos indiretos quanto por métodos diretos de diagnóstico (GUZMÁN-VERRI et al., 2012). No Brasil, a infecção já foi confirmada por meios de testes sorológicos e moleculares de diagnóstico em diversas espécies de cetáceos, contudo, o isolamento bacteriano não foi realizado em território brasileiro até o momento (ATTADEMO et al., 2018; SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2018, 2019).

No presente estudo, um animal da espécie *S. guianensis* apresentou resultado positivo no teste molecular, consistindo no segundo relato de infecção por *Brucella* nesta espécie de golfinho. O primeiro espécime de *S. guianensis* acometido por *Brucella* foi descrito por SANCHEZ-SARMIENTO et al. (2019), num animal jovem, encontrado encalhado no litoral do Espírito Santo, Brasil, com um resultado de PCR

positivo em linfonodo pulmonar e com quadro de hepatite necrotizante e coinfeção por morbilivírus (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2019).

O exame histopatológico do animal que resultou positivo para brucelose no presente estudo foi realizado num estudo prévio, conduzido por BRITO (2015) no qual foi feita a análise histopatológica em amostras de tecidos de cetáceos e sirênios provenientes do ICMBio/CMA. Neste estudo, o diagnóstico etiológico não foi realizado, apenas o diagnóstico histopatológico. Os resultados deste estudo indicam que o animal infectado por *Brucella* apresentou degeneração e necrose hepática, além de hiperplasia focal do epitélio da vesícula urinária, mas ausências de alterações em coração, rins e testículos (BRITO, 2015).

A infecção por *Brucella* em mamíferos marinhos é conhecida pelo potencial de causar infecções crônicas com o comprometimento de múltiplos órgãos e sinais clínicos variáveis, conforme o órgão acometido, a suscetibilidade do hospedeiro e a presença de coinfeções. O envolvimento hepático na brucelose já foi descrito em outras espécies de mamíferos marinhos. GONZÁLEZ-BARRIENTOS et al. (2010) relataram a ocorrência de hepatite linfocítica periportal em cinco espécimes de *S. coeruleoalba* que também apresentavam quadro de meningoencefalite associada à infecção por *Brucella*.

Amostras de fígado não estavam disponíveis para a análise molecular no presente estudo e o DNA de *Brucella* foi detectado em tecido renal, apesar da ausência de lesões renais.

A detecção de DNA bacteriano e mesmo o isolamento de *Brucella* já foi descrito em tecido renal de espécimes de *P. phocoena* que não apresentavam lesões associadas à infecção por *Brucella*, bem como no rim de *Lagenorhynchus acutus* com quadro de mastite crônica associada a necrose coagulativa no fígado, possivelmente associada à infecção e em *Lagenorhynchus albirostris* com infiltrado de macrófagos no baço fígado e linfonodos, possivelmente associados à brucelose (FOSTER et al., 2002).

O insucesso no isolamento bacteriano pode ser decorrente do prolongado período em que a amostra permaneceu armazenada, o que pode ter inviabilizado o crescimento bacteriano.

Quanto à infecção por morbilivírus em cetáceos, estudos anteriores têm sugerido que algumas espécies de cetáceos parecem ser mais suscetíveis à infecção, devido à ocorrência de epizootias com elevada mortalidade, como os golfinhos-

listrados (*S. coeruleoalba*) e golfinhos-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*) (SHIMIZU et al., 2013; VAN BRESSEM et al., 2014). Recentemente, a alta suscetibilidade à infecção em *S. guianensis* foi demonstrada após um evento de alta mortalidade ocorrido no litoral do Rio de Janeiro, Brasil, que acarretou mortalidade de aproximadamente 250 animais (GROCH et al., 2018), causado pela variante GDMV. Até o momento, esta é a única variante de morbilivírus em mamíferos aquáticos identificada no Oceano Atlântico Sul.

No caso relatado no presente estudo, a indisponibilidade de amostras para a realização de exames histopatológico não possibilitou associar o morbilivírus detectado à causa da morte ou à ocorrência de infecção de caráter agudo ou crônico.

Há apenas cinco amostras de morbilivírus provenientes de cetáceos no Brasil com sequências disponíveis nos bancos de dados de sequências (três provenientes de *S. guianensis* e duas de *Eubalena australis*), sendo todas elas classificadas como GDMV, com base nas sequências parciais do gene codificador da fosfoproteína (disponíveis para as cinco amostras) e do gene codificador da RNA polimerase viral (disponível para uma amostra viral, detectada em *S. guianensis* no Rio de Janeiro, porém, correspondendo a um fragmento distinto do obtido no presente estudo, impossibilitando portanto, a comparação entre elas) (GROCH et al., 2014, 2018). De acordo com GROCH et al. (2014), o fragmento do gene codificador da RNA polimerase sequenciado nas amostras detectadas em *S. guianensis* também apresentou identidade variando entre 74 e 75% em relação a outros morbilivírus de cetáceos e com outras espécies de morbilivírus (GROCH et al., 2018). Assim, com os dados disponíveis, não se pode descartar que a variante viral detectada no presente trabalho seja distinta de GDMV.

Os morbilivírus detectados em *S. guianensis* até o presente momento no Brasil foram verificados em animais na região sudeste, nos Estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro. Os resultados aqui apresentados sugerem que a infecção possa ocorrer de maneira mais abrangente nesta espécie de golfinho, uma vez que foi detectada em animal encontrado encalhado no estado de Alagoas.

Os resultados apresentados no presente estudo alertam para a importância de se realizar o monitoramento sanitário sistemático em cetáceos na costa brasileira, quanto à ocorrência de infecções por *Brucella* e *Morbillivirus*, incluindo análises moleculares, histopatológicas e imuno-histoquímicas em todo animal que vier a encalhar, o que possibilitará a obtenção de informações epidemiológicas importantes

quanto ao impacto destes patógenos nas populações de cetáceos. No caso da brucelose, um monitoramento desta natureza poderá auxiliar a esclarecer quais as espécies e variantes de *Brucella* circulantes na região, incluindo a identificação de variantes zoonóticas; identificar as principais manifestações clínicas e lesões associadas à infecção nas diversas espécies de cetáceos; identificar quais as espécies de mamíferos aquáticos atuam como hospedeiros preferenciais; e promover proteção à saúde dos profissionais que atuam diretamente no atendimento a encalhes e na reabilitação de mamíferos marinhos.

Já no caso da infecção por morbilivírus, o monitoramento sanitário sistemático poderá fornecer subsídios para elucidar questões epidemiológicas importantes, como determinar a ocorrência de outras variantes de morbilivírus no país; avaliar o potencial de transmissão do GDMV para outras espécies de mamíferos marinhos; determinar o padrão de lesões teciduais nos animais acometidos para averiguar a ocorrência de infecções agudas, subagudas e crônicas nos indivíduos acometidos.

Além disso, monitoramentos sanitários sistemáticos poderão promover a obtenção de um acervo de amostras de animais infectados, que possibilitará, no futuro, o desenvolvimento de testes laboratoriais para o rápido diagnóstico destas infecções.

Um monitoramento desta natureza é especialmente relevante no caso de populações de *S. guianensis*, por se tratar de espécie classificada como “quase ameaçada de extinção” pela *IUCN Red List of Threatened Species* (SECCHI *et al.*, 2018) e por constar no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção como vulnerável (ICMBio/MMA, 2018).

O boto-cinza ou golfinho-da-guiana (*S. guianensis*), inserido na subordem dos odontocetos, é uma espécie endêmica da costa Atlântica tropical e subtropical da América Central e do Sul, ocorrendo desde La Mosquita, Honduras Central (14°N), até Florianópolis, Santa Catarina (27°S), Brasil (LODI; BOROBIA, 2013). Possui hábitos alimentares oportunistas, de acordo com a disponibilidade de recursos, formando agregações temporárias durante a alimentação. Laços sociais duradouros foram verificados apenas entre os pares de fêmeas e filhotes (LODI; BOROBIA, 2013). É uma espécie costeira e habita baías, foz de rios e ambientes próximos às praias. Sua distribuição costeira torna o boto-cinza mais vulnerável aos impactos antrópicos. Sabe-se que capturas acidentais em redes de pesca são uma das principais ameaças,

sendo a segunda espécie, depois da toninha (*Pontoporia blainvillei*), mais capturada em artefatos de pesca (LODI; BOROBIA, 2013).

Além dos impactos antrópicos, a ocorrência de enfermidades transmissíveis, especialmente aquelas que apresentam alta transmissão, como a morbilivirose, pode causar declínio populacional significativo em populações animais pequenas e localizadas, como é o caso desta espécie de golfinho (GROCH et al., 2018), cujos impactos em termos de conservação são difíceis de mensurar.

Ainda que não tenham sido verificadas evidências de infecções por *Brucella* e *Morbillivirus* nas populações de sirênios analisadas neste estudo, a avaliação contínua da presença destes patógenos nesse táxon pode ser relevante, devido aos crescentes impactos antrópicos a que esses animais estão sujeitos, os quais podem influenciar na dinâmica de ocorrência de enfermidades transmissíveis.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir:

- Não foram verificadas evidências sorológicas ou moleculares de infecção por *Brucella spp* e *Morbillivirus* em sirênios brasileiros.
- A infecção por *Brucella ceti* foi identificada por meio do diagnóstico molecular em um espécime de *Sotalia guianensis* no estado de Pernambuco, Brasil.
- A infecção por *Morbillivirus* foi identificada por meio do diagnóstico molecular em um espécime de *Sotalia guianensis* no estado de Alagoas, Brasil.

9. REFERÊNCIAS

- ALBA, P.; TERRACCIANO, G.; FRANCO, A.; LORENZETTI, S.; COCUMELLI, C.; FICHI, G.; ELENI, C.; ZYGMUNT, M.S.; CLOECKAERT, A.; 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.
- ALTON, G. G.; JONES, L.M.; PIETZ, D.E. Tecnicas de laboratório em la brucelosis. **Ginebra: Organizacion Mundial de La Salud**, 109p, 1976.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W, LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v. 25, n.17, p. 3389-402, 1997.
- ATTADEMO, F.L.N.; SILVA, J.C.R.; LUNA, F.O.; IKEDA, J.; FOPPEL, E.F.C.; SOUSA, G.P.; FREIRE, A.C.B.; SOARES, R.M.; FAITA, T.; BATINGA, M.C.A.; KEID, L.B. Retrospective survey for pathogens in stranded marine mammals in northeastern Brazil: *Brucella* spp. infection in a clymene dolphin (*Stenella clymene*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.54, n.1, p.151–155, 2018.
- ATTADEMO, F. L.N. **Detecção da infecção de rotavírus, coronavírus, enterobactérias, *Leptospira* spp., *Brucella abortus* e *Toxoplasma gondii* em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) em cativeiro no Brasil**. 2014.140 p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2014.
- BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. S.; STOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 271-275, 1992.
- BALMER, B.; ZOLMAN, E.; ROWLES, T.; SMITH, C.; TOWNSEND, F.; FAUQUIER, D.; GEORGE, C.; GOLDSTEIN, T.; HANSEN, L.; QUIGLEY, B.; MCFEE, W.; MOREY, J.; ROSEL, P.; SALIKI, J.; SPEAKMAN, T.; SCHWACKE, L. Ranging patterns, spatial overlap, and association with dolphin morbillivirus exposure in

common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) along the Georgia, USA coast. **Ecology and Evolution**, v.8, n.24, p.12890-12904, 2018.

BARNES, L. G.; DOMNING, D. P; RAY, C.E. Status of Studies on fóssil marine mammals. **Marine mammal Science**, v.1, n.1, p. 15-53,1985.

BARRETO, A.S; CAMPOS, C.C.R.; ROSAS, F.W.; JUNIOR, J.M.S; ROSA, L.D.; FLORES, P.A.C; SILVA, V.M.F. **Plano de Ação Nacional para a conservação dos mamíferos aquáticos**: pequenos cetáceos. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. ICMBio,132 p, 2010.

BARRETT, T.; VISSER, I.K.; MAMAEV, L.; GOATLEY, L.; VAN BRESSEM, M.F.; OSTERHAUS, A.D. Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. **Virology**, v. 193, p. 1010–1012, 1993.

BATINGA, M.C.A.; DE LIMA, J.T.R.; GREGORI, F.; DINIZ, J.A.; MUNER, K.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; FERREIRA, H.L.; SOARES, R.M.; KEID, L.B. Comparative application of IS711-based polymerase chain reaction (PCR) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for canine brucellosis diagnosis. **Molecular and Cellular Probes**,v.39, p.1-6, 2018.

BELLIÈRE, E. N.; ESPERÓN, F.; VISCAÍNO-SÁNCHEZ, J. M. Genetic Comparison Among Dolphin Morbillivirus in the 1990–1992 and 2006–2008 - Mediterranean outbreaks. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 1913-1920, 2011.

BENTO, M.C.R.M; EIRA, C.I.C.S.; VINGADA, J.V.; MARÇALO, A.L.; FERREIRA, M.C.T.; FERNANDEZ, A.L.; TAVARES, L.M.M.; DUARTE, A.I.S.P. New insight into dolphin morbillivirus phylogeny and epidemiology in the northeast Atlantic: opportunistic study in cetaceans stranded along the Portuguese and Galician coasts. **BMC Veterinary Research**, v.12, n.176, 2016.

BOSSART, G.D. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. Wildlife and Marine Mammals. **Veterinary pathology**, v.48, n.3, 2011.

BOSSART, G.D.; REIF, J.S.; SCHAEFER, A.M.; GOLDSTEIN, J.; FAIR, P.A; SALIKI, J.T. Morbillivirus infection in free-ranging Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Southeastern United States: seroepidemiologic and pathologic evidence of subclinical infection. **Veterinary Microbiology**, v.143, n.2-4, p.160-166, 2010.

BREW, S.D.; PERRET, L.L.; STACK, J.A.; MACMILLAN A.P.; STAUNTON, N.J. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. **Veterinary record**, p.144-483, 1999.

BRICKER, B.J.; EWALT, D.R.; HALLING, S.M. *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). **BMC Microbiology**, v.3, n.15, 2003.

BRICKER, B.J. PCR as diagnostic tool for Brucellosis. **Veterinary microbiology**, v.90, n 1-4, p.435-446, 2002.

BRITO, A.P.D. **Avaliação histopatológica de mamíferos marinhos encalhados no litoral do nordeste brasileiro**. 2015. Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Rio Grande do Norte, 2015.

BUCK, J.D.; SPOTTE, S. The occurrence of potentially pathogenic vibrios in marine mammals. **Marine Mammal Science**, v.2, p.319-324, 1986.

BUCKLE, K.; ROE, W.D.; HOWE, L.; MICHAEL, S.; DUIGNAN, P.J.; BURROWS, E.; HUMPHREY, S.; MCDONALD, W.L. Brucellosis in Endangered Hector's Dolphins (*Cephalorhynchus hectori*). **Veterinary Pathology**, v.54, n.5, p.838-845, 2017.

BUDDLE, M. B. Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. **The Journal of Hygiene** (Lond.), v. 54, n. 3, p. 351-364, 1956.

BURGESS, TL; JOHNSON, CK; BURDIN, A; GILL, VA; DOROFF, AM; TUOMI, P; SMITH, WA; GOLDSTEIN, T. *Brucella* Infection in Asian Sea Otters (*Enhydra lutris lutris*) on Bering Island, Russia. **Journal of Wildlife Diseases**, v.53, n.4, p.864-868, Oct., 2017.

CÂMARA, I. G.; PALLAZZO, J.T. Novas informações sobre a presença de *Eubalaena australis* no Sul do Brasil. **Actas da I Reunión de Trabajos de Especialistas em Mamíferos Marinos de América del Sur**. Buenos Aires, 25-29 de Jun.1984. p. 35-41,1986.

CARMICHAEL, L.E.; BRUNER, D.W. Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. **The Cornell Veterinarian**, v.48, n.4, p.579-92. 1968.

CASSLE, S.E.; JENSEN, E.D.; SMITH, C.R.; MEEGAN, J.M.; JOHNSON, S.P.; LUTMERDING, B.; RIDGWAY, S.H.; FRANCIS-FLOYD, R. Diagnosis and successful treatment of a lung abscess associated with *Brucella* species infection in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**.v.44, n.2, p.495-9, 2013.

CFSPH.The Center for Food Security and Public Health.**Brucellosis in marine mammals**.College of veterinary medicine.Iowa State University.Ames.Iowa 50011.2007.

CHANG, W.J.; PIEN, F.D. Marine-acquired infections: hazards of the ocean environment. **Journal of Postgraduate Medicine**, v.80, p.30-33,1986.

CLOECKAERT, A; VERGER, JM; GRAYON, M; PAQUET, JY; GARIN-BASTUJI, B; FOSTER, G; GODFROID, J. Classification of *Brucella spp.* isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. **Microbes and Infection**, v. 3, n.9, p.729-38, 2001.

CLOECKAERT, A.; VERGER, J.M.; GRAYON, M.; GREPINET, O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. **The Journal of Microbiology**, v.141, n.9, p. 2111-2121, 1995.

CORBEL, M. J.; BANAI, M. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173 AL. In: Garrity, GM, editor. **Bergey's manual of systematic bacteriology** vol. 2: The Proteobacteria: Part B. Baltimore (MD): Williams and Wilkins, p. 377-388, 2005.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. *In*: First International Conference on Emerging Zoonosis, 1997, Jerusalem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n.2, p. 213-221, 1997.

COWAN, D.F. Pathology. *In*: PERRIN, W.F.; WURSIG, B.; THEWISSEN, H.G.M.(Eds.). **Encyclopedia of marine mammals**. San Diego. Academic Press, p.883-890, 2002.

CVETNIĆ, Z.; DUVNJAK, S.; DURAS, M.; GOMERČIĆ, T.; ZDELAR-TUK, M.; REIL, I.; HABRUN, B.; ŠPIČIĆ, S. Brucellosis in marine mammals, with special emphasis on the Republic of Croatia. Rad 530. **Medical Sciences**, v.44, p. 9-24.2017.

CUBAS, Z.S; SILVA, J.C.R; DIAS, J.L.C. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Ed.Roca, 2014. 2.ed.

DAWSON, C. E.; PERRETT, L. L.; STUBBERFIELD, E. J.; STACK, J. A; FARRELLY, S. S. J.; COOLEY, W. A; DAVISON, N. J.; QUINNEY, S. Isolation and characterization of *Brucella* from the lungworms of a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). **Journal of wildlife diseases**, v. 44, n. 2, p. 237–46, 2008a.

DEUTSCH, C.J.; SELF-SULLIVAN, C.; MIGNUCCI-GIANNONI, A. ***Trichechus manatus*. The IUCN Red List of Threatened Species** 2008: e.T22103A9356917. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T22103A9356917.en>. 2008. Downloaded on 30 August 2019.

DÍAZ-DELGADO, J.; GROCH, K.R.; SIERRA, E.; SACCHINI, S.; ZUCCA, D.; QUESADA-CANALES, Ò.; ARBELO, M.; FERNÁNDEZ, A.; SANTOS, E.; IKEDA, J.; CARVALHO, R.; AZEVEDO, A.F.; LAILSON-BRITO JR, J.; FLACH, L.; RESSIO, R.; KANAMURA, C.T.; SANSONES, M.; FAVERO, C.; PORTER, B.F.; CENTELLEGHE, C.; MAZZARIOL, S.; DI RENZO, L.; DI FRANCESCO, G.; DIA GUARDO, G.; CATÃO-DIAS, J.L. Comparative histopathologic and viral immunohistochemical studies on CeMV infection among Western Mediterranean, Northeast-Central, and Southwestern Atlantic cetaceans. **PLoS ONE**, v. 14, n.3, 2019.

DI GUARDO, G.; MAZZARIOL, S. Cetacean Morbillivirus-Associated Pathology: Knowns and Unknowns. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n.112, 2016.

DI GUARDO, G.; MAZZARIOL, S. Cetacean Morbillivirus in Northern and Southern Hemispheres. **Frontiers in Microbiology**, v.5, n. 211, 2014.

DI GUARDO, G.; MAZZARIOL, S.; FERNANDEZ, A. Biologically Threatened Dolphins and Whales. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 2833-2834, 2011.

DOMINGO, M.; VISA, J.; PUMAROLA, M.; MARCO, A.; FERRER, L.; RABANAL, R.; KENNEDY, S. Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). **Veterinary Pathology**, v. 29, n.1, p.1–10,1992.

DUIGNAN, P. J.; HOUSE, C.; WALSH, M. T.; CAMPBELL, T.; BOSSART, G. D.; DUFFY, N.; FERNANDES, P. J.; RIMA, B. K.; WRIGHT, S.; GERACI, J. R. Morbillivirus infection in manatees. **Marine Mammal Science**, v.11, n.4, p.441-451,1995.

DUNCAN, C; DICKERSON, B; PABILONIA, K; MILLER, A; GELATT, T. Prevalence of *Coxiella burnetii* and *Brucella spp.* in tissues from subsistence harvested northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) of St. Paul Island, Alaska. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.56, n.67, 2014.

DUNN, J.L.; BUCK, J.D.; ROBECK, T.R.**Bacterial diseases of cetaceans and pinnipeds**. In: DIERAUF, L.A.; GULLAND, F.M.D.(Eds.).CRC Handbook of marine mammal medicine: Health, disease and rehabilitation. Florida: Boca Raton, 2001.CRC Press.cap.16, p.309-335, 2 ed.

ECHEVERRI-ZULUAGA, M.; DUQUE-GARCÍA, Y.H.; RUIZ-SAENZ, J. Morbillivirus de los Delfines: Patógeno re-emergente en la población de cetáceos.**Universitas Scientiarum**, v.20, n.1, p.29-41, 2015.

EISENBERG, T.; RIßE, K.; SCHAUERTE, N.; GEIGER, C.; BLOM, J.; SCHOLZ, H.C.Isolation of a novel 'atypical' *Brucella* strain from a bluespotted ribbontail ray (*Taeniura lymma*). **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.110, n.2, p.221-234, 2017.

EL-TRAS, W.F.; TAYEL, A.A.; ELTHOLTH, M.M.; GUITIAN, J. *Brucella* infection in freshwater fish: evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. **Veterinary Microbiology**, v.141, p.321-325, 2010.

EL-SAYED, A; AWAD, W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, p. S31–S35, 2018

EWALT, D.R.; PAYEUR, J.B.; MARTIN, B.M.; CUMMINS, D.R.; MILLER, W.G. Characteristics of a *Brucella* species from a bottle-nosed-dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of veterinary diagnosis investigation**, v.6, p. 448-452,1994.

FAUQUIER, D.A.; LITZ, J.; SANCHEZ, S.; COLEGROVE, K.; SCHWACKE, L.H.; HART, L; SALIKI, J.; SMITH, C.; GOLDSTEIN, T.; BOWEN-STEVENSON, S.; MCFEE, W.; FOUGERES, E.; MASE-GUTHRIE, B.; STRATTON, E.; EWING, R.; VENN-WATSON, S.; CARMICHAEL, R.H.; CLEMONS-CHEVIS, C.; HATCHETT, W.; SHANNON, D.; SHIPPEE, S.; SMITH, S.; STAGGS, L.; TUMLIN, M.C.; WINGERS, N.L.; ROWLES, T.K. Evaluation of morbillivirus exposure in cetaceans from the northern Gulf of Mexico 2010–2014. **Endangered Species Research**, v.33, n.1, p.211–220, 2017.

FERNANDEZ, A.; ESPERON, F.; HERRAEZ, P.; DE LOS MONTEROS, A.E.; et al. Morbillivirus and pilot whale deaths, Mediterranean Sea. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.792–794, 2008.

FLACH, L.; ALONSO, M.B.; MARINHO, T.; WAEREBEEK, K.V.; VAN BRESSEM, M.F. Clinical signs in free-ranging guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) during a morbillivirus epidemic: case study in Sepetiba Bay, Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.133, n.3, p.175–180, 2019.

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.

FOSTER, G.; MACMILLAN, A.P.; GODFROID, J.; HOWIE, F.; ROSS, H.M.; CLOECKAERT, A.; REID, R.J.; BREW, S.; PATTERSON, I.A.P. A review of *Brucella* sp infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. **Veterinary microbiology**, v.90, n.1-4, p.563-580, 2002.

FUGIER, E.; PAPPAS, G.; GORVEL, J.P. Virulence factors in brucellosis: implications for a etiopathogenesis and treatment. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.9, n.35, p.1-10, 2007.

GERACI, J.R.; LOUNSBURY, V.J. **Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings**. Second ed. Baltimore: National Aquarium in Baltimore, 2005.

GILBERT, A.T.; FOOKS, A.R.; HAYMAN, D.T.; HORTON, D.L.; MÜLLER, T.; PLOWRIGHT, R.; PEEL, A.J.; BOWEN, R.; WOOD, J.L.; MILLS, J.; CUNNINGHAM, A.A.; RUPPRECHT, C.E. Deciphering serology to understand the ecology of infectious diseases in wildlife. **Ecohealth**, v.10, n.3, p.298-313, 2013 .

GLOWACKA, P.; ŻAKOWSKA, D.; NAYLOR, K.; NIEMCEWICZ, M.; BIELAWSKA-DRÓZD, A. *Brucella*–Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. **Polish Journal of Microbiology**, v.67, n.2, p.151–161, 2018.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J.P.; KOHLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVENS, K.; GARIN-BASTUJI, B.; LETESSON, J.J. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Veterinary Research**, v.36, n.3, p.313–326, 2005.

GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R.; MORALES, J. A.; HERNÁNDEZ-MORA, G.; BARQUERO-CALVO, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; CHAVES-OLARTE, E.; MORENO, E. Pathology of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) infected with *Brucella ceti*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142., n.4, p. 347–352, 2010.

GROCH, K.R.; GROCH, K.R.; KOLESNIKOVAS, C.K.M.; DE CASTILHO, P.V.; MOREIRA, L.M.P.; BARROS, C.R.M.B.; MORAIS, C.R.; RENAULT-BRAGA, E.P.; SIERRA, E.; FERNANDEZ, A.; CATÃO-DIAS, J.L.; DÍAZ-DELGADO, J. Cetacean

morbillivirus in southern right whales, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.66, n.1, p.606–610, 2019.

GROCH, K. R.; SANTOS-NETO, E. B.; DÍAZ-DELGADO, J.; IKEDA, J. M. P.; CARVALHO, R. R.; OLIVEIRA, R. B.; CATÃO-DIAS, J. L. Guiana dolphin unusual mortality event and link to cetacean morbillivirus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.24, n.7, p.1349–1354, 2018.

GROCH, K.R.; COLOSIO, A.C.; MARCONDES, M.C.; ZUCCA, D.; DÍAZ-DELGADO, J.; NIEMEYER, C.; MARIGO, J.; BRANDÃO, P.E.; FERNÁNDEZ, A.; CATÃO-DIAS, L. J. Novel cetacean morbillivirus in Guiana dolphin, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.20, n.3, p.511-513, 2014.

GUZMÁN-VERRI, C.; GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R.; HERNÁNDEZ-MORA, G.; MORALES, J.A.; BAQUERO-CALVO, E.; CHÁVES-OLARTE, E.; MORENO, E. *Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n.3, 2012.

HALL, J. A. BioEdit: a user-friendly sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**.v. 41, p. 95-98, 1999.

HARMS, C. A.; MAGGI, R. G.; BREITSCHWERDT, E. B.; CLEMONS-CHEVIS, C. L.; SOLANGI, M.; ROSTEIN, D.S.; FAIR, P.A.; HANSEN, L. J.; HOHN, A. A.; LOVEWELL, G. N.; MCLELLAN, W. A.; PABST, D. A.; ROWLES, T. K.; SCHWACKE, L. H.; TOWNSEND, F. I.; WELLS, R. S. Bartonella species detection in captive stranded and free-ranging cetaceans. **Veterinary Research**, v.39, n.6, 2008.

HARTMAN, D.S. **Ecology and behavior of the manatee (*Trichechus manatus*) in Florida**. New York: Special Publication n.5, 1979. American Society of Mammalogists. 153 p.

HERNÁNDEZ-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.

HERNÁNDEZ-MORA, G.; MANIRE, C.A.; GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R.; BARQUERO-CALVO, E.; GUZMÁNVERRI, C; STAGGS, L; THOMPSON, R; CHAVES-OLARTE, E.; MORENO, E. Serological diagnosis of *Brucella* infections in odontocetes. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, n.6, p.906– 915, 2009.

HERNÁNDEZ-MORA, G.; GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R.; MORALES, J.A.; OLARTE, E.C.; GUZMÁNVERRI, C.; CALVO, E.B.; DE-MIGUEL, M.J.; MARÍN, C.M.; BLASCO, J.M.; MORENO, E. Neurobrucellosis in stranded dolphins, Costa Rica. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.11, p.1430–1433, 2008.

HETZEL, B.; LODI, L. **Baleias, botos e golfinhos: Guia de Identificação para o Brasil**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1993. 279 p.

HIGGINS, R. Bacteria and fungi of marine mammals: A review. **Canadian Veterinary Journal**, v.41, n.2, p.105-116, 2000.

HOWARD, E.B.; BRITTJR, J.O.; MATSUMOTO, G.K.; ITAHARA, R.; NAGANO, C.N. Diseases Bacterial. In: HOWARD, E.B.(Ed.). **Pathobiology of marine mammal diseases**. Florida: CRC Press, 1983. 248p.

IBAMA. **Mamíferos Aquáticos do Brasil: Plano de Ação**. versão II, 2ª ed. Brasília: Ibama, 2001. 102 p.

ICMBio/MMA. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume I**. 1. ed. Brasília: 2018. 492 p.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2016. **Virus Taxonomy: Release**. Disponível em: < <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> >. Acesso em: 10 mai .2018.

ISIDORO-AYZA, M.; RUIZ-VILLALOBOS, N.; PÉREZ, L.; GUZMÁN-VERRI, C.; MUÑOZ, P.M.; ALEGRE, F.; BARBERÁN, M.; CHACÓN-DÍAZ, C.; CHAVES-OLARTE, E.; GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R.; MORENO, E.; BLASCO, J.M.; DOMINGO, M. *Brucella ceti* infection in dolphins from the Western Mediterranean sea. **BMC Veterinary Research**, v.10, n.206, 2014.

JEPSON,P.D.; BREW, S.; MACMILLAN,A.P.; BAKER, J.R.; BARNETT,J.; KIRKWOOD, J.K.; KUIKEN, T.; ROBINSON, I.R.; SIMPSON, V.R. Antibodies to Brucella in marine mammals around the coast of England and Wales. **Veterinary Record**, v.141, n. 20, p.513-515, 1997.

JOHNSTON, D.G.; FUNG, J. Bacterial flora of wild and captive porpoises. **Journal of Occupational Medicine**, v.11, n.5, p.276-277, 1969.

KATSUMATA, E.; OHISHI, K.; MARUYAMA, T. Rehabilitation of a rescued pygmy sperm whale stranded on the Pacific Coast of Japan. Published in: **Oceans '04 MTS/IEEE Techno-Ocean '04** (IEEE Cat. No.04CH37600), p.488-491, 2004.

KEMPER, C.M.; TOMO, I.; BINGHAM, J.; BASTIANELLO, S.S.; WANG, J.; GIBBS, S.E.; WOOLFORD, L.; DICKASON, C.; KELLY, D. Morbillivirus-associated unusual mortality event in South Australian bottlenose dolphins is largest reported for the Southern Hemisphere. **Royal Society Open Science**, v.3, n.12, 2016.

KENNEDY, S.; SMYTH, J.; MCCULLOUGH, S.; ALLAN, G.; MCQUAID, S. Viral distemper now found in porpoises. **Nature**, v.336, n.21, 1988.

KNAP, A.; DEWAILLY, E.; FURGAL, C.; GALVIN J.; BADEN D.; BOWEN, R.E. Indicators of ocean health and human health: developing a research and monitoring framework. **Environmental Health Perspectives**, v.110, n.9, p. 839-845, 2002.

KNIPE D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 6th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2013.2456 p.

KNIPE, D.; HOWLEY, P. **Fundamental Virology**. 4^o ed. Philadelphia: Lippencott Williams and Wilkins, 2001. 3280p.

KREIZINGER,Z.; FOSTER,J.T.; RÓNAI,Z.; SÚLYOK,K.M.; WEHMANN,E.; JÁNOSI, S.; GYURANECZ, M. Genetic relatedness of Brucella suis biovar 2 isolates from hares, wild boars and domestic pigs. **Veterinary Microbiology**. v.172, n.3-4, p.492-498. 2014.

LAGE, A.P.; ROXO, E.; MULLER, E.E.; POESTER, F.P.; CAVALLÉRO, J.C.M.; FERREIRA NETO, J.S.; MOTA, P.M.P.C.; GONÇALVES, V.S.P. **Programa**

Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT).

Manual Técnico. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: MAPA/DAS/DSA, 2006.188p.

LE FLÈCHE, P.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; AL DAHOUK, S.; BOUCHON, P.; DENOEUDE, F.; NOCKLER, K.; NEUBAUER, H.; GUILLLOTEAU, L.A.; VERGNAUD, G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. **BMC Microbiology**, v.6, n.9, 2006.

LIPSCOMB, T.; SCHULMAN, F.; MOFFETT, D.; KENNEDY, S. Morbilliviral Disease in Atlantic bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) from the 1987-1988. Epizootic. **Journal of Wildlife Diseases**, v.30, n.4, p.567-571, 1994.

LODI, L.; BOROBIA, M. **Baleias, botos e golfinhos do Brasil: guia de identificação**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2013.479p.

LOPEZ-GOÑI, I.; GARCÍA-YOLDI, D.; MARÍN, C.M.; MIGUEL, M.J. DE; MUNOZ, P.M.; BLASCO, J.M.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; CLOECKAERT, A.; FERREIRA, A.C.; CARDOSO, R.; CORRÊA DE SÁ, M.I.; WALRAVENS, K.; ALBERT, D.; GARIN-BASTUJI, B. Evaluation of a multiplex PCR assay (bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species , including the vaccine strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.10, p.3484–3487. 2008.

LUNA, F.O.; ANDRADE, M.C.M.; REIS, M.L.**Plano de Ação Nacional para a conservação dos sirênios: peixe-boi-da-amazônia: *Trichechus inunguis* e peixe-boi marinho: *Trichechus manatus***.Série Espécies Ameaçadas. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011.80 p.

MAQUART, M.; LE FLÈCHE, P.; FOSTER, G.; TRYLAND, M.; RAMISSE, F.; DJØNNE, B.; AL DAHOUK, S.; JACQUES, I.; NEUBAUER, H.; WALRAVENS, K.; GODFROID, J; CLOECKAERT, A.; VERGNAUD, G. MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*. **BMC Microbiology**. v.9, n.145, 2009.

MARMONTEL, M.; DE SOUZA, D.; KENDALL, S. *Trichechus inunguis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016:

e.T22102A43793736. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016->

2.RLTS.T22102A43793736.en. 2016. Downloaded on 20 August 2019.

MCCULLOUGH, S.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G.; KENNEDY, S.; SMYTH, J.; COSBY, S. Isolation and characterization of a porpoise morbillivirus. **Archives of Virology**, v.118, n.3-4, p.247-252,1991.

MCDONALD, W.L.; JAMALUDIN, R.; MACKERETH, G.; HANSEN, M.; HUMPHREY, S.; SHORT, P. Characterization of a *Brucella* sp strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zeland. **Journal of clinical microbiology**, v.44, n.12, p. 4363-4370, 2006.

MEEGAN, J.; DUNN, J.L.; VENN-WATSON, S.K.; SMITH, C.R. et al. Serologic response in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* infected with *Brucella* sp. using a dolphin specific indirect ELISA. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.102, n.1, p.73–85. 2012.

MEEGAN, J.; FIELD, C.; SIDOR, I.; ROMANO, T.; CASINGHINO, S.; SMITH, C.R.; KASHINSKY, L.; FAIR, P.A.; BOSSART, G.; WELLS, R.; DUNN, J.L. Development, validation, and utilization of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Brucella* species in marine mammals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22, n.6, p.856-862, 2010.

MEYER, K. F.; SHAW, E. B. A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis* from cattle. Studies of the genus *Brucella* nov. gen. **Journal of Infectious Diseases**, v. 27, n.3, p. 173-184, 1920.

MIRANDA, A.V.; LUNA, F.O.; SOUSA, G.P.; FRUET, P.F.; ZANONI, S.A. **Guia Ilustrado de Identificação de Cetáceos e Sirênios do Brasil**. Brasília: ICMBio/CMA, 2019.70 p.

NAVARRO, E.; ESCRIBANO, J.; FERNANDEZ, J.A.; SOLERA, J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella spp* in human blood samples.

Immunology and medical microbiology, v. 34, n.2, p.147-151, 2002.

NYMO, I.H.; SEPPOLA, M.; AL DAHOUK, S.; BAKKEMO, K.R.; JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M.P.; GODFROID, J.; LARSEN, A.K. Experimental Challenge of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) with a *Brucella pinnipedialis* strain from hooded seal (*Cystophora cristata*). **PLoS One**, v.11, n.7, 2016.

ODEGAARD, O.A.; KROGSRUD, J.R. Rabies in Svalbard: infection diagnosed in artic fox, reindeer and seal. **Veterinary Record**, v.109, p.141-142,1981.

OHISHI, K.; ZENITANI, R.; BANDO, T.; GOTO, Y.; UCHIDA, K.; MARUYAMA, T.; YAMAMOTO, S.; MIYAZAKI, N.; FUJISE, Y. Pathological and serological evidence of Brucella-infection in baleen whales (Mysticeti) in the western North Pacific. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.26, n.2, p.125-136, 2003.

PAPPAS, G.; AKRITIDIS, N.; BOSILKOVSKI, M.; TSIANOS, E. Brucellosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 2325–2336, 2005.

PAUTASSO, A.; IULINI, B.; GRATTAROLA, C.; GIORDA, F.; GORIA, M.; PELETTI, S.; MASOERO, L.; MIGNONE, W.; VARELLO, K.; PETRELLA, A.; CARBONE, A.; PINTORE, A.; DENURRA, D.; SCHOLL, F.; CERSINI, A.; PULEIO, R.; PURPARI, G.; LUCIFORA, G.; FUSCO, G.; DI GUARDO, G.; MAZZARIOL, S.; CASALONE, C. Novel dolphin morbillivirus (DMV) outbreak among Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) in Italian waters. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.132, n.3, p.215-220, 2019.

PELETTI, S.; CARUSO, C.; CERUTTI, F.; MODESTO, P.; BIOLATTI, C.; PAUTASSO, A.; GRATTAROLA, C.; GIORDA, F.; MAZZARIOL, S.; MIGNONE, W.; MASOERO, L.; CASALONE, C.; ACUTIS, P.L. Efficient isolation on Vero Dog SLAM tag cells and full genome characterization of Dolphin Morbillivirus (DMV) by next generation sequencing. **Scientific Reports**, v.8, n.1, 2018.

PERRINE D.; RIPPLE, J. **Manatees and Dugongs of the World**. Worldlife Discovery Guides. U.S.A: Voyageur Press, 2002.131p.

POWELL, J.A. **Sirenians**. In: FOLKENS, P.A.; REEVES, R.R.; CLAPHAM, P.J.; STEWART, B. S.; POWELL, J.A. National Audubon Society Guide to Marine Mammals of the World. 1ª Ed. New York: Knopf Publisher, 2002. 528 p.

RAGA, J.A.; BANYARD, A.; DOMINGO, M.; CORTEYN, M.et al. Dolphin morbillivirus epizootic resurgence, Mediterranean Sea. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.3, p.471–473, 2008.

REIDARSON, T.; MCBAIN, J.; HOUSE, C.; KING, D.; STOTT, J.; KRAFFT, A. Morbillivirus infection in stranded common dolphins from the Pacific Ocean. **Journal of Wildlife Diseases**, v.34, n.4, 771-776, 1998.

ROCCA, MAYARA PEREIRA. **Pesquisa de infecção por *Brucella spp* em botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*) de vida livre procedentes da reserve de desenvolvimento sustentável de Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil**. 2014. Dissertação-Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. São Paulo, 2014.

RÓNAI, Z.; KREIZINGER, Z.; DÁN, Á.; DREES, K.; FOSTER, J.T.; BÁNYAI, K.; MARTON, S.; SZEREDI, L.; JÁNOSI, S.; GYURANE, C.Z. M. First isolation and characterization of *Brucella microti* from wild boar. **BMC Veterinary Research**, v.11, n.147, 2015.

ROSS, H.M.; FOSTER, G.; REID, R.J. Brucella species infection in sea mammals. **Veterinary records**, v.134, n.14, p.359-364,1994.

RUBIO-GUERRI, C.; JIMÉNEZ, M.A.; MELERO, M.; DÍAZ-DELGADO, J.; SIERRA, E.; ARBELO, M.; BELLIERE, E.N.; CRESPO-PICAZO, J.L.; GARCÍA-PÁRRAGA, D.; ESPERÓN, F.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. Genetic heterogeneity of dolphin morbilliviruses detected in the Spanish Mediterranean in inter-epizootic period. **BMC Veterinary Research**, v.14, n.248, 2018.

RUBIO-GUERRI, C.; MELERO, M.; ESPERÓN, F.; BELLIERE, E. N.; ARBELO, M.; CRESPO, J. L.; SIERRA, E.; GARCÍA-PÁRRAGA, D.; SÁNCHEZ-VISCAÍNO, J. M. Unusual striped dolphin Mass Mortality Episode Related to Cetacean Morbillivirus in the Spanish, Mediterranean Sea. **BCM Veterinary Research**, v.9, n.106, 2013.

SALIKI, J.T.; LEHENBAUER, T.W. Monoclonal Antibody-Based Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Morbillivirus Antibody in Marine Mammal Sera. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.5, p. 1877–1881, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.999p.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; CARVALHO, V.L.; DÍAZ-DELGADO, J.; RESSIO, R.A.; FERNANDES, N.C.C.A.; GUERRA, J.M.; SACRISTÁN, C.; GROCH, K.R.; SILVESTRE-PEREZ, N. ; FERREIRA-MACHADO, E.; COSTA-SILVA, S.; NAVAS-SUÁREZ, P.; MEIRELLES, A.C.O.; FAVERO, C.; MARIGO, J. ; BERTOZZI, C.P.; COLOSIO, A.C.; MARCONDES, M.C.C.; CREMER, M.J.; SILVA, N.S. ; NETO, J.S.F. ; KEID, L.B. ; SOARES, R.; SIERRA, E. ; FERNÁNDEZ, A.; CATÃO-DIAS, J.L. Molecular, serological, pathological, immunohistochemical and microbiological investigation of *Brucella* spp. in marine mammals of Brazil reveals new cetacean hosts. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.66, n.4, p.1674-1692, 2019.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; CARVALHO, V.L.; MEIRELLES, A.C.O.; GRAVENA, W.; MARIGO, J.; SACRISTÁN, C.; COSTA-SILVA, S.; GROCH, K.R.; SILVA, N.S.; NETO, J.S.F.; CATÃO-DIAS, J.L. Survey of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. antibodies in cetaceans and manatees of the Amazon basin and Atlantic Ocean, Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.132, n.1, p.1-11, 2018.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; CARVALHO, V.L.; SACRISTÁN, C.; GROCH, K.R.; RESSIO, R.A.; FERNANDES, N.C.C.A.; GUERRA, J.M.; COSTA-SILVA, S.; DÍAZ-DELGADO, J.; FAVERO, C.M. Brucellosis in a clymene dolphin (*Stenella clymene*) stranded in Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.65, n.1, 2017.

SARGENT, E. Tetracycline for seal finger. **Journal of the American Medical Association**, v.244, n.5, p.436-437, 1980.

SASAKI, D.M.; MINETTE, H.P. Isolation of salmonellosis in a public marine aquarium. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 187, n.11, p.1221-1222, 1985.

SCHOLZ, H. C.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; AL DAHOUK, S.; HAMMERI, J. A.; ZYGMUNT, M. S.; CLOECKAERT, A.; KOYLASS, M.; WHATMORE, A. M.; BLOM, J.; VERGNAUD, G.; WITTE, A.; AISTLEITNER, K.; HOFER, E. *Brucella vulpis* sp. nov, isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*).

Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 66, n. 5, p. 2090-2098, 2016a.

SCHOLZ, H. C.; MÜHLDOFER, K.; SHILTON, C.; SURESH, B.; WHATMORE, A. M.; BLOM, J.; EISENBERG, T. Worldwide emergence of genetically diverse *Brucella* isolates in exotic frogs provides insights into *Brucella* evolution. **PLoS One**, v. 30, n. 11-12, 2016b.

SCHOLZ, H.C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, 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.

Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 60, n.4, p.801–808, 2010.

SCHOLZ, H. C.; HOFER, E.; VERGNAUD, G.; LE FLÈCHE, P.; WHATMORE, A. M.; AL DAHOUK, S.; PFEFFER, M.; KRUGER, M.; CLOECKAERT, A.; TOMASO, H. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in Lower Australia. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 2, p. 153-156, 2009.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; NESVADBOVA, J.; TOMASO, H.; VERGNAUD, G.; LE FLÈCHE, P.; WHATMORE, A. M.; AL DAHOUK, S.; KRUGER, M.; LODRI, C. PFEFFER, M. Isolation of *Brucella microti* from soil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1316-1317, 2008a.

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.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n.2, p. 375–382, 2008b.

SCHOROEDER, J.P.; WALLACE, J.G.; CATES, M.B.; GRECO, S.B.; MOORE, P.W.B. An infection by *Vibrio alginolyticus* in an Atlantic bottlenose dolphin housed in an open ocean pen. **Journal of Wildlife Diseases**, v.21, n.4, p.437-438, 1985.

SCHULMAN, F.Y.; LIPSCOMB, T.P.; MOFFETT, D.; KRAFFT, A.E.; LICHY, J.H.; TSAI, M.M.; TAUBENBERGER, J.K.; KENNEDY, S. Histologic, immunohistochemical, and polymerase chain reaction studies of bottlenose dolphins from the 1987–1988 United States Atlantic coast epizootic. **Veterinary Pathology**, v.34, n.4, 288–295, 1997.

SECCHI, E.; SANTOS, M.C. DE O.; REEVES, R. 2018. *Sotalia guianensis* (errata version published in 2019). **The IUCN Red List of Threatened Species** 2018: e.T181359A144232542. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T181359A144232542.en>. Downloaded on 30 August 2019.

SHIMIZU, Y.; OHISHI, K.; SUZUKI, R.; TAJIMA, Y.; YAMADA, T.; KAKIZOE, Y. *et al.* Aminoacid sequence variations of signaling lymphocyte activation molecule and mortality caused by morbillivirus infection in cetaceans. **Microbiology and Immunology**, v.57, n.9, p.624–632, 2013.

SICILIANO, S. **Características da população de baleias-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) da costa brasileira, com especial referência aos Bancos de Abrolhos**. 1997.113 p. Tese. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1997.

SIERRA, E.; FERNÁNDEZ, A.; ZUCCA, D.; CÂMARA, N.; FELIPE-JIMÉNEZ, I.; SUÁREZ-SANTANA, C.; QUIRÓS, Y.B.; DÍAZ-DELGADO, J.; ARBELO, M. Morbillivirus infection in Risso's dolphin *Grampus griseus*: a phylogenetic and

pathological study of cases from the Canary Islands. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.129, n.3, p.165–174, 2018.

SMITH, A.W.; VEDROS, N.A.; AKERS, T.G.; GILMARTIN, W.G. Hazards of disease transfer from marine mammals to land mammals: Review and recent findings.

Journal of the American Veterinary Medical Association, v.173, n.9, p.1131-1133, 1978.

SOHN, A.H.; PROBERT, W.S.; GLASER, C.A.; GUPTA, N.; BOLLEN, A.W.; WONG, J.D.; GRACE, E.M.; MCDONALD, W.C. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. **Emerging infectious diseases**, v.9, n.4, p.485-488, 2003.

SOSIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the under explored “rarebiosphere”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America**; v.103, n.32, p.12115–12120, 2006.

SOTO, S.; ALBA, A.; GANGES, L.; VIDAL, E.; RAGA, J.A.; ALEGRE, F.; GONZÁLEZ, B.; MEDINA, P.; ZORRILLA, I.; MARTÍNEZ, J.; MARCO, A.; PÉREZ, M.; PÉREZ, B.; PÉREZ, D.E.; VARGAS MESAS, A.; MARTÍNEZ VALVERDE, R.; DOMINGO, M. Post-epizootic chronic dolphin morbillivirus infection in Mediterranean striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.96, n.3, p.187-94, 2011.

SRIVASTAVA, A.; CHAUDHARY, H.S. Brucellosis: Its Diagnosis, Prevention and Treatment. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.3, n.6, p.912-917, 2011.

STEPHENS, N.; DUIGNAN, P. J.; WANG, J.; BINGHAM, J.; FINN, H.; BEJDER, L.; PATTERSON, A. P.; HOLYOAKE, C. Cetacean Morbillivirus in Coastal Indo-Pacific Bottlenose Dolphins, Western Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, 2014.

STOENNER, H. G.; LACKMAN, D. B. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 18, n. 69, p. 947-951, 1957.

STROUD, R.K.; ROFFE, T.J. Causes of death in marine mammals stranded along the Oregon Coast. **Journal of Wildlife Diseases**, v.15, n.1, p. 91-97, 1979.

SUÁREZ-ESQUIVEL, M.; BAKER, K.S.; RUIZ-VILLALOBOS, N.; HERNÁNDEZ-MORA, G.; BARQUERO-CALVO, E.; GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R.; CASTILLO-ZELEDÓN, A.; JIMÉNEZ-ROJAS, C.; CHACÓN-DÍAZ, C.; CLOECKAERT, A.; CHAVES-OLARTE, E.; THOMSON, N.R.; MORENO, E.; GUZMÁN-VERRI, C. *Brucella* Genetic Variability in Wildlife Marine Mammals Populations Relates to Host Preference and Ocean Distribution. **Genome Biology and Evolution**, v.9, n.7, p.1901-1912, 2017.

SULZNER, K.; JOHNSON, C.K.; BONDE, R.K.; GOMEZ, N.A.; POWELL, J.; NIELSEN, K.; 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*). **PLOS ONE**, v.7, n.9, 2012.

TABOR, G.M. **Defining conservation medicine**. IN: AGUIRRE, A.A; OSTELD, R.S.; TABOR, G.M.; HOUSE, C.; PEARI, M.C. Conservation medicine: ecological health in practice. New York: Oxford University Press, 2002.407 p.

TACHIBANA, M.; WATANABE, K.; KIM, S.; OMATA, Y.; MURATA, K.; HAMMOND, T.; WATARAI, M. Antibodies to *Brucella* spp. in Pacific bottlenose dolphins from the Solomon Islands. **Journal of Wildlife Diseases**, v.42, n.2, p.412-414, 2006.

TAUBENBERGER, J.K.; TSAI, M.M.; ATKIN, T.J.; FANNING, T.G.; KRAFFT, A.E.; MOELLER, R.B. Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (*Globicephalus melas*). **Emerging Infectious Disease**, v.6, n.1, p.42-45, 2000.

THAKUR, S.D.; VAID, R.K.; PANDA, A.K.; SAINI, Y. Marine mammal brucellosis: a new dimension to an old zoonosis. **Current Science**, v.103, n.8, 2012.

TESSARO, S.V.; FORBES, L.B. *Brucella suis* biotype 4: a case of granulomatous nephritis in a barren ground caribou (*Rangifer tarandus groenlandicus* L.) with a review of the distribution of rangiferine brucellosis in Canada. **Journal of Wildlife Diseases**, v.22, n.4, p.479-483, 1986.

TILLER, R.V.; GEE, J.E.; LONSWAY, D.R.; GRIBBLE, S.; BELL, S.C.; JENNISON, A.V.; BATES, J.; COULTER, C.; HOFFMASTER, A.R.B.K. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52year-old patient with chronic destructive pneumonia. **BMC Microbiology**, v.10, n.23, 2010b.

TILLER, R.V.; GEE, J.E.; FRACE, M.A.; TAYLOR, T.K.; SETUBAL, J.C.; HOFFMASTER, A.R.B.K. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.17, p.5837-5845, 2010a.

TONG, S.; CHERN, S.W.; LI, Y.; PALLANSCH, M.A.; ANDERSON, L.J. Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel Paramyxoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.8, p.2652-2658, 2008.

TRAUM, J. Annual Report to the Chief of the Bureau of Animal Industry. **USDA Bureau of Animal Industry**, p. 30, 1914.

TRYLAND, M.; KLEIVANE, L.; ALFREDSSON, A.; KJELD, M.; ARNASON, A.; 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.

VAN BRESSEM, M. F.; DUIGNAN, P. J.; BANYARD, A.; BARBIERI, M.; COLEGROVE, K. M.; DE GUISE, S.; DI GUARDO, G.; DOBSON, A.; DOMINGO, M.; FAUQUIER, D.; FERNÁNDEZ, A.; GOLDSTEIN, T.; GRENFELL, B.; GROCH, K. R.; GULLAND, F.; JENSEN, B. A.; JEPSON, P. D.; HALL, A.; KUIKEN, T.; MAZZARIOL, S.; MORRIS, S. E.; NIELSEN, O.; RAGA, J. A.; ROWLES, T. K.; SALIKI, J.; SIERRA, E.; STEPHENS, N.; STONE, B.; TOMO, I.; WANG, J.; WALTZEK, T.; WELLEHAN, J. F. Cetacean Morbillivirus: Current Knowledge and Future Directions. **Viruses**, v. 6, n.12, p. 5145-5181, 2014.

VAN BRESSEM, M. F.; RAGA, J. A.; DI GUARDO, G.; JEPSON, P. D.; DUIGNAN, P. J.; SIEBERT, U.; BARRETT, T.; SANTOS, M. C. O.; MORENO, I. B.; SICILIANO, S.; VIEIRA, R. G.; ACQUA-COUTINHO, S. D. Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.86, n.2, p.143-157, 2009.

VAUGHAN, K.; CREW, J.D.; HERMANSON, G.; WLOCH, M.K.; RIFFENBURGH, R.H.; SMITH, C.R.; VAN BONN, W.G. A DNA vaccine against dolphin morbillivirus is immunogenic in bottlenose dolphins. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.120, n.3-4, p. 260-266, 2007.

VERBORGH, P.; GAUFFIER, P.; ESTEBAN, R.; GIMENEZ, J.; CANADAS, A.; SALAZAR-SIERRA, J.M.; DE STEPHANIS, R. Conservation status of long-finned pilot whales, *Globicephala melas*, in the Mediterranean Sea. **Advances in Marine Biology**, v.75, p.173–203, 2016.

VERNAA, F.; GIORDAA, F.; MICELIA, I.; RIZZO, G.; PAUTASSO, A.; ROMANO, A.; IULINIA, B.; PINTOREA, M.D.; MIGNONE, W.; GRATTAROLA, C.; BOZZETTA, E.; VARELLO, K.; DONDO, A.; CASALONE, C.; GORIA, M. Detection of morbillivirus infection by RT-PCR RFLP analysis in cetaceans and carnivores. **Journal of Virological Methods**, v.247, p.22–27, 2017.

VERGER, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D.; GRAYON, M. *Brucella*, a Monospecific Genus as Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.35, n. 3, p. 292-295, 1985.

VISSER, L. K. G.; BRESSEM, M. F. V.; BILDT, M. W. G. V.; GROEN, J.; ORVELL, C.; RAGA, J. A.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Prevalence of Morbilliviruses Among Pinniped and Cetacean Species. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 1, n. 12, p. 197-202, 1993.

WEBSTER, R.G.; GERACI, J.; PETURSSON, G.; SKIRNISSON, K. Conjunctivitis in human beings caused by influenza A virus of seals. **The New England Journal of Medicine**, v.304, n.15, p. 911, 1981.

WEST, K.L.; LEVINE, G.; JACOB, J.; JENSEN, B.; SANCHEZ, S.; COLEGROVE, K.; ROTSTEIN, D. Coinfection and Vertical Transmission of *Brucella* and *Morbillivirus* in a neonatal sperm whale (*Physeter macrocephalus*) in Hawaii, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, v.51, n.1, p.227-232, 2014.

WHATMORE, A.M.; DAWSON, C.; MUCHOWSKI, J.; PERRETT, L.L.; STUBBERFIELD, E.; KOYLAS KOYLASS, M.; FOSTER, GEOFFREY.; DAVISON, J.N.; QUANCE, C.; SIDOR, I.F.; FIELD, C.L.; LEGE, J. Characterisation of North American *Brucella* isolates from marine mammals. **PLoS ONE**, v.12, n.9, 2017.

WHATMORE, A.M.; KOYLASS, M.S.; MUCHOWSKI, J.; EDWARDS-SMALLBONE, J.; GOPAUL, K.K.; PERRETT, L.L. Extended multilocus sequence analysis to describe the global population structure of the genus *Brucella*: Phylogeography and relationship to biovars. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n.2049, 2016.

WHATMORE, A. M.; DAVISON, N.; CLOECKAERT, A.; AL DAHOUK, S.; ZYGMUNT, M. S.; BREW, S. D.; PERRETT, L. L.; KOYLASS, M. S.; VERGNAUD, G.; QUANCE, C.; SCHOLZ, H.C; DICK, E. J. JR.; HUBBARD, G.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n.12, p. 4120-4128, 2014.

WHATMORE, A.M.; PERRETT, L.L.; MACMILLAN, A.P. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. **BMC Microbiology**, v.7, n.34, 2007.

WHATMORE, A.M.; SHANKSTER, S.J.; PERRETT, L.L.; MURPHY, T.J.; BREW, S.D.; THIRLWALL, R.E.; CUTLER, S.J.; MACMILLAN, A.P. Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.6, p.1982-1993, 2006.

WIEBE, W.; LISTON, J. **Studies of the aerobic nonexacting, heterotrophic bacteria of the bentos**. In: PRUTER A.T.; ALVERSON, D.D.(Ed.)The Columbia River Estuary and Adjacent Ocean Waters. Seattle: University of Washington Press,1972.868 p.

WILLIAMSON, G.R. Minke whales of Brazil. **Scientific Reports of the Whales Research Institute**, v. 27, p.37-59, 1975.

WU, Q.; CONWAY, J.; PHILLIPS, K.M.; STOLEN, M.; DURDEN, W.N.; FAUQUIER, D.; MCFEE, W.E.; SCHWACKE, L. Detection of *Brucella* spp in bottlenose dolphins

(*Tursiops truncatus*) by a real-time PCR using blowhole swabs. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.120, n.3, p.241–244, 2016.

ZERBINI, A.N.; SECCHI, E.R.; BASSOI, M.; ROSA, L.D.; HIGA, A.; SOUSA, L.; MORENO, I.B.; MÖLLER, L.M.; CAON, G. **Distribuição e abundância relativa de cetáceos na Zona -Econômica Exclusiva da Região Sudeste-Sul do Brasil**. Série documentos Revizee: Score Sul. São Paulo: USP, 2004. Instituto Oceanográfico.

ZERBINI, A.N.; SECCHI, E.R.; SICILIANO, S.; SIMÕES-LOPES, P.C. Review of the occurrence and distribution of whales of the genus *Balaenoptera* along the Brazilian Coast. **Report of the International Whaling Commission**, v. 47, p.407-417, 1997.

ZERBINI, A.N.; SECCHI, E.R.; SICILIANO, S.; SIMÕES-LOPES, P.C. The dwarf form of the minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) (Lacépède, 1804) in Brazil. **Report of the International Whaling Commission**, v.46, p. 333-340, 1996.

ANEXOS

Anexo 1: Licença pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), obtida para a realização do presente trabalho.

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: 45568-2	Data da Emissão: 08/12/2017 16:14	Data para Revalidação*: 07/01/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: GLAUCIA PEREIRA DE SOUSA	CPF: 805.705.851-04
Título do Projeto: Avaliação sanitária em mamíferos aquáticos brasileiros	
Nome da Instituição: CONSERVAÇÃO E MANEJO DE MAMÍFEROS AQUÁTICOS	CNPJ: 08.829.974/0008-60

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e análise de amostras	10/2016	12/2018
2	Divulgação dos resultados	10/2016	12/2019

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas 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 ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que 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, 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/cgen .
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.

Outras ressalvas

1	O pesquisador deverá anexar no relatório apresentado ao SISBIO toda a publicação científica resultante de suas atividades na APA Costa dos Corais. Não será permitido atividades na Zona de Preservação da Vida Marinha e na Zona de Visitação da APA Costa dos Corais (verificar Plano de Manejo da UC no site: www.icmbio.gov.br/apacostadoscorais) A utilização do material biológico coletado para outra finalidade que não acessas as condições de saúde dos animais examinados não está prevista neste Parecer e requer solicitação específica.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Lara Borges Keid	análise de amostras	213.151.718-13	267326944 SSP-SP	Brasileira
2	Fabia de Oliveira Luna	pesquisadora	012.615.617-40	4490921 SSP-RJ	Brasileira
3	FERNANDA LOFFLER NIEMEYER ATTADAMO	veterinária	073.122.037-44	101387959 IFP-RJ	Brasileira
4	JAIRO MOURA DE OLIVEIRA	veterinário	271.454.414-20	2190248 SSP/PE-PE	Brasileira
5	DANIELLA CARVALHO RIBEIRO	veterinária	252.741.678-02	278815388 SSP-SP	Brasileira
6	IRAN CAMPELLO NORMANDE	biólogo	038.767.114-52	7409009 SSPPE-PE	Brasileira
7	JOAO CARLOS GOMES BORGES	veterinário	858.346.025-68	5.863.960 SSP-SC	Brasileira

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

Código de autenticação: 18831344

Página 1/3

Anexo 1 Continuação: Licença pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), obtida para a realização do presente trabalho.

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: 45568-2	Data da Emissão: 08/12/2017 16:14	Data para Revalidação*: 07/01/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: GLAUCIA PEREIRA DE SOUSA	CPF: 805.705.851-04
Título do Projeto: Avaliação sanitária em mamíferos aquáticos brasileiros	
Nome da Instituição: CONSERVAÇÃO E MANEJO DE MAMÍFEROS AQUÁTICOS	CNPJ: 08.829.974/0008-60

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BARRA DE SANTO ANTONIO	AL	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL COSTA DOS CORAIS	UC Federal
2		PB	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DA BARRA DO RIO MAMANGUAPE	UC Federal
3	SANTAREM	PA	ZOOFIT	Fora de UC Federal
4		PE	Local de ocorrência da espécie	Fora de UC Federal
5		AL	Local de ocorrência da espécie	Fora de UC Federal
6		PB	Local de ocorrência da espécie	Fora de UC Federal
7	PRESIDENTE FIGUEIREDO	AM	CPPMA-CENTRO DE PRESERVAÇÃO E PESQUISA DE MAMÍFEROS AQUÁTICO	Fora de UC Federal
8		PE	Programa Peixe-Boi-CEPENE-Ilha de Itamaracá	Fora de UC Federal

1	Amostras biológicas	Urina, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fezes, Sangue, Regurgitação/conteúdo estomacal, Ectoparasita, Pêlo, Fragmento de tecido/órgão, Outras amostras biológicas
2	Método de captura/coleta	Outros métodos de captura/coleta
3	Método de marcação	Outros métodos de marcação

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Trichechus manatus
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Trichechus manatus, Trichechus inunguis
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Trichechus manatus, Sotalia guianensis, Pontoporia blainvillei, Megaptera novaeangliae
4	Marcação de animais silvestres in situ	Trichechus manatus

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Cetáceos)	Sangue, Outras amostras biológicas, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele
2	Amostras biológicas (Sirênios)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fezes, Secreção, Fragmento de tecido/órgão, Sangue
3	Método de captura/coleta (Cetáceos)	Outros métodos de captura/coleta(manual)
4	Método de captura/coleta (Sirênios)	Captura manual
5	Método de marcação (Sirênios)	Telemetria via satélite, Outros métodos de marcação(cookie)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	CONSERVAÇÃO E MANEJO DE MAMÍFEROS AQUÁTICOS	colecção

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

Código de autenticação: 18831344

Página 2/3

Anexo 1 Continuação: Licença pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), obtida para a realização do presente trabalho.

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: 45568-2	Data da Emissão: 08/12/2017 16:14	Data para Revalidação*: 07/01/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: GLAUCIA PEREIRA DE SOUSA	CPF: 805.705.851-04
Título do Projeto: Avaliação sanitária em mamíferos aquáticos brasileiros	
Nome da Instituição: CONSERVAÇÃO E MANEJO DE MAMÍFEROS AQUÁTICOS	CNPJ: 08.829.974/0008-60

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 18831344

Página 3/3

Anexo 2: Licenças do Instituto de Proteção Ambiental do Amazonas (IPAAM), obtidas para a realização do presente trabalho.

GOVERNO DO ESTADO AMAZONAS
AUTORIZAÇÃO DE TRANSPORTE DE ANIMAIS, PARTES, PRODUTOS E
SUBPRODUTOS DE ANIMAIS SILVESTRES Nº 005/17

INTERESSADO: Eletrobrás Amazonas Geração e Transmissão de Energia S.A.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA: Rua Tito Bittencourt, 142, Sala 15, 2º Andar, São Francisco, Manaus/AM. CEP: 69.079-040.

CNPJ/CPF: 02.341.467/0016-07 **INSCRIÇÃO ESTADUAL:** ---

FONE: (92) 3632-8624 ou 3632-8689 **PROCESSO Nº:** 0166.2017

REGISTRO NO IPAAM: ---

Tipo: Fauna silvestre nativa

IDENTIFICAÇÃO E ENDEREÇO DE ORIGEM: CPPMA - Centro de Pesquisa e Preservação de Mamíferos Aquáticos. BR 174, KM 103, Vila de Balbina, Presidente Figueiredo/AM.

IDENTIFICAÇÃO E ENDEREÇO DE DESTINO: LMSA&SA – USP - Laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar da Universidade de São Paulo. Campus Fernando Costa, Universidade de São Paulo - Av. Duque de Caxias Norte, 225 - Zona Rural, Pirassununga - SP, 13635-900. Tel: (19) 3565-4200

MEIO DE TRANSPORTE/ TIPO / IDENTIFICAÇÃO DO(S) VEÍCULO(S): Fluvial / Aéreo / Terrestre

ITINERÁRIO RESUMIDO: Balbina / Presidente Figueiredo-AM – Manaus/AM – São Paulo/SP – Pirassununga/SP

RESPONSÁVEL(EIS) PELO TRANSPORTE (NOME/FUNÇÃO/CPF): Daniella Carvalho Ribeiro de Oliveira, Médica Veterinária, 252.741.678-02

DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS (QUANTIDADE/ESPÉCIE/ESPECIFICAÇÃO): Sangue, *swabs* de mucosas, fezes e tecidos fixados em formol e/ou etanol e/ou congelados

PETRECHOS: Caixa de transporte

PRAZO DE VALIDADE DESTA AUTORIZAÇÃO: 15 dias a partir da data de emissão.

Manaus-AM, 23 de Janeiro de 2017.

Artemisia Souza do Valle
Diretora Técnica

Ana Eunice Aleixo
Diretora Presidente

IMPORTANTE:

- O uso irregular desta **Autorização** implica na sua cassação, bem como nas sanções previstas na legislação;
- Esta **Autorização** não contém emendas ou rasuras;
- Esta **Autorização** deve permanecer no local da coleta para efeito de fiscalização (frente e verso);
- Esta **Autorização** não permite: captura/coleta/transporte/soltura de espécies em área particular sem o consentimento do proprietário; Captura/coleta/transporte/soltura de espécies em unidades de conservação federais, estaduais, distritais ou municipais, salvo quando acompanhadas da anuência do órgão administrador competente; coleta de material biológico por técnicos não listados nesta autorização; exportação de material biológico; acesso ao patrimônio genético, nos termos da regulamentação constante na Lei Federal 13.123 de 20 de maio de 2015.

Av. Mario Ypiranga Monteiro, 3280 - Parque 10 de Novembro
Fone: (92) 2123-6760 / Fax: 2123-6756
Manaus - AM - CEP: 69.050-030
web: www.ipaam.am.gov.br

IPAAM
Instituto de Proteção Ambiental
do Amazonas

Anexo 2 Continuação: Licenças do Instituto de Proteção Ambiental do Amazonas (IPAAM), obtidas para a realização do presente trabalho.

AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO DA FAUNA SILVESTRE PARA FINS CIENTÍFICOS Nº 039/17

INTERESSADO: Eletrobrás Amazonas Geração e Transmissão de Energia S.A.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA: Rua Tito Bittencourt, 142 Sala 15, 2º Andar, São Francisco, Manaus/AM. CEP: 69.079-040.

CNPJ/CPF: 02.341.467/0016-07

FONE: (92) 3632-8624 ou 3632-8689

REGISTRO NO IPAAM: --

Tipo: Fauna silvestre nativa

INSCRIÇÃO ESTADUAL: ---

DOCUMENTO Nº: 6092/17

PROCESSO Nº: 0166.2017

IDENTIFICAÇÃO E ENDEREÇO DE ORIGEM: Rua Imperatriz, 210, Campo Dourado, Cidade Nova I, Manaus/AM.

IDENTIFICAÇÃO E ENDEREÇO DE DESTINO: Laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar da Faculdade de Zootecnia e de Engenharia de Alimentos da Faculdade de São Paulo – FZEA USP.

MEIO DE TRANSPORTE/ TIPO / IDENTIFICAÇÃO DO(S) VEÍCULO(S): Aéreo

ITINERÁRIO RESUMIDO: Coleta e transporte de material biológico de peixes-bois mantidos em cativeiro no Centro de preservação e pesquisa de mamíferos aquáticos. Tais amostras consistirão em: sangues, swabs de mucosa, fezes e tecidos fixados em formol e/ou etanol e/ou congelados, enviará as amostras, que serão retirados no aeroporto de Viracopos.

RESPONSÁVEL(EIS) PELO TRANSPORTE (NOME/FUNÇÃO/CPF): Médica Veterinária Daniella Carvalho Ribeiro Oliveira, CPF: 252.741.678-02.

DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS (QUANTIDADE/ESPÉCIE/ESPECIFICAÇÃO): sangues, swabs de mucosa, fezes e tecidos fixados em formol e/ou etanol e/ou congelados.

PRAZO DE VALIDADE DESTA AUTORIZAÇÃO: 30 dias

Manaus-AM, 07 de Novembro de 2017.

Maria Gorete M. da Silva
Diretora Técnica

Fábio Rodrigues Marques
Diretor Jurídico,
no exercício da Presidência

IMPORTANTE:

- Caso ocorra mudanças no itinerário, veículos, condutores, ou qualquer outro tipo de alteração, esta Autorização não terá validade
- O uso irregular desta Autorização implica na sua cassação, bem como nas sanções previstas na legislação;
- Esta Autorização não contém emendas ou rasuras;
- Esta Autorização deve permanecer junto com o animal para efeito de fiscalização;
- Esta Autorização não permite: captura/coleta/transporte/soltura de espécies em área particular sem o consentimento do proprietário; Captura/coleta/transporte/soltura de espécies em unidades de conservação federais, estaduais, distritais ou municipais, salvo quando acompanhadas da anuência do órgão administrador competente; coleta de material biológico por técnicos não listados nesta autorização; exportação de material biológico; acesso ao patrimônio genético, nos termos da regulamentação constante na Lei Federal 13.123, de 20 de maio de 2015.

Av. Mario Ypiranga Monteiro, 3280 - Parque 10 de Novembro
Fone: (92) 2123-6760 / Fax: 2123-6766
Manaus - AM - CEP: 69.050-030
web: www.ipaam.am.gov.br

INSTITUTO DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DO AMAZONAS

GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

Anexo 3: Identificação dos sirênios e cetáceos necropsiados e avaliados quanto à infecção por *Brucella* e *Morbillivirus* utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Identificação do animal	Instituição de origem	Local de origem	Data da coleta	Espécie	Sexo	PCR <i>Brucella</i> spp.	Nested-PCR Paramixovírus
1	CMA/ICMBio	Pernambuco	2005	<i>Sotalia guianensis</i>	M	RIM*	RIM
2	CMA/ICMBio	Pernambuco	10/01/2013	<i>Sotalia guianensis</i>	nd	FIG	FIG
3	CMA/ICMBio	Alagoas	13/01/2013	<i>Sotalia guianensis</i>	nd	FIG, RIM	FIG, RIM
4	CMA/ICMBio	nd	15/02/2013	<i>Pontoporia blainvillei</i>	nd	FIG, RIM, TON	FIG, RIM, TON
5	CMA/ICMBio	nd	26/02/2013	<i>Sotalia guianensis</i>	nd	FIG, RIM	FIG, RIM
6	CMA/ICMBio	nd	13/03/2013	<i>Sotalia guianensis</i>	nd	FIG	FIG, RIM
7	CMA/ICMBio	Alagoas	14/03/2010	<i>Sotalia guianensis</i>	F	FIG, RIM	FIG*, RIM*
8	CMA/ICMBio	nd	nd	<i>Sotalia guianensis</i>	nd	COR, FIG	FIG

(Continua)

Anexo 3 Continuação: Identificação dos sirênios e cetáceos necropsiados e avaliados quanto à infecção por *Brucella* e *Morbillivirus* utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Identificação do animal	Instituição de origem	Local de origem	Data da coleta	Espécie	Sexo	PCR <i>Brucella</i> spp.	Nested-PCR Paramixovírus
9	CMA/ICMBio	Pernambuco	28/09/2006	<i>Sotalia guianensis</i>	M	COR, FIG, RIM	FIG, RIM
10	CMA/ICMBio	nd	10/09/2013	<i>Sotalia guianensis</i>	M	BAC	BAC
11	CMA/ICMBio	Pernambuco	10/12/2010	<i>Tursiops truncatus</i>	F	COR, FIG	FIG
12	CMA/ICMBio	nd	25/11/2011	<i>Sotalia guianensis</i>	F	COR, FIG	FIG
13	CMA/ICMBio	Alagoas	05/03/2012	<i>Grampus griseus</i>	M	COR, RIM	PUL, RIM
14	CMA/ICMBio	Alagoas	2012	<i>Stenella clymene</i>	M	COR, FIG, PUL	FIG, PUL
15	CMA/ICMBio	nd	nd	<i>Sotalia guianensis</i>	nd	PUL, RIM	PUL, RIM
16	CMA/ICMBio	Alagoas	2007	<i>Physeter macrocephalus</i>	M	PUL, RIM	PUL, RIM
17	CMA/ICMBio	nd	nd	<i>Sotalia guianensis</i>	nd	FIG, PUL	FIG, PUL

(Continua)

Anexo 3 Continuação: Identificação dos sirênios e cetáceos necropsiados e avaliados quanto à infecção por *Brucella* e *Morbillivirus* utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Identificação do animal	Instituição de origem	Local de origem	Data da coleta	Espécie	Sexo	PCR <i>Brucella</i> spp.	Nested-PCR Paramixovírus
18	CMA/ICMBio	Pernambuco	2012	<i>Stenella clymene</i>	M	FIG	FIG
19	CMA/ICMBio	nd	nd	<i>Megaptera novaeangliae</i>	nd	PUL, RIM	PUL, RIM
20	FMA	nd	nd	<i>Sotalia guianensis</i>	nd	CER, CRB, FIG, PUL, RIM, LPL	-
21	FMA	nd	nd	<i>Sotalia guianensis</i>	nd	COR, ENC, FIG, PUL	-
22	FMA	nd	nd	<i>Sotalia guianensis</i>	nd	BAC, PAN, PUL, RIM	-
23	FMA	nd	nd	<i>Sotalia guianensis</i>	nd	COR, FIG, PUL, RIM	-
24	CMA/ICMBio	Pernambuco	17/11/2016	<i>T. manatus</i>	F	FIG, GLM, RIM	FIG, GLM, RIM
25	CMA/ICMBio	nd	nd	<i>T. manatus</i>	F	FIG, RIM	FIG, RIM
26	CMA/ICMBio	Pernambuco	26/12/2003	<i>T. manatus</i>	F	BAC, FIG, PUL	BAC, PUL, FIG

(Continua)

Anexo 3 Continuação: Identificação dos sirênios e cetáceos necropsiados e avaliados quanto à infecção por *Brucella* e *Morbillivirus* utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Identificação do animal	Instituição de origem	Local de origem	Data da coleta	Espécie	Sexo	PCR <i>Brucella</i> spp.	Nested-PCR Paramixovírus
27	CMA/ICMBio	nd	nd	<i>T. manatus</i>	nd	FIG	FIG
28	CMA/ICMBio	Pernambuco	28/10/2014	<i>T. manatus</i>	M	PUL, RIM	PUL, RM
39	CMA/ICMBio	Pernambuco	07/12/2008	<i>T. manatus</i>	F	CER, COR, PUL, RIM	CER, PUL, RIM
30	CMA/ICMBio	Pernambuco	17/01/2004	<i>T. manatus</i>	M	BAC, FIG, LFN, PUL, RIM	BAC, FIG, LFN, PUL, RIM
31	CMA/ICMBio	Pernambuco	07/04/2008	<i>T. manatus</i>	M	COR, FIG, INT, PUL, RIM	FIG, INT, PUL, RIM
32	CMA/ICMBio	Pernambuco	13/03/2011	<i>T. manatus</i>	M	FIG	FIG
33	CMA/ICMBio	Pernambuco	21/11/2007	<i>T. manatus</i>	F	FIG	FIG
34	CMA/ICMBio	Pernambuco	13/05/2012	<i>T. manatus</i>	M	BAC, COR, FIG, PUL	FIG, PUL
35	CPPMA	Amazonas	11/09/2011	<i>T. inunguis</i>	M	ADR, BAC, CER, COR, FIG, INT, PAN, PUL, RIM, TES	ADR, BAC, CER, FIG, PUL, RIM

(Continua)

Anexo 3 Continuação: Identificação dos sirênios e cetáceos necropsiados e avaliados quanto à infecção por *Brucella* e *Morbillivirus* utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Identificação do animal	Instituição de origem	Local de origem	Data da coleta	Espécie	Sexo	PCR <i>Brucella</i> spp.	Nested-PCR Paramixovírus
36	CPPMA	Amazonas	15/07/2012	<i>T. inunguis</i>	M	BAC, COR, COT, FIG, INT, LFN, MED, PLA, PUL, RIM	BAC, FIG, LFN, MED, PUL, RIM
37	CPPMA	Amazonas	17/01/2013	<i>T. inunguis</i>	M	BAC, CER, COR, FIG, INT, PUL, RIM	BAC, CER, FIG, PUL, RIM
38	CPPMA	Amazonas	nd	<i>T. inunguis</i>	F	PLA	-
39	CPPMA	Amazonas	22/11/2017	<i>T. inunguis</i>	F	BAC, CER, COR, FIG, LFN, LAX, PUL, OVA, RIM, UTE	BAC, CER, FIG, LFN, LAX, PUL, RIM
40	CPPMA	Amazonas	06/11/2012	<i>T. inunguis</i>	F	BAC, FIG, PLA, PUL	FIG, PUL
41	CPPMA	Amazonas	14/06/2010	<i>T. inunguis</i>	F	CER, COR, FIG, LFN, PAN, PUL, RIM, TCA	CER, LFN, PUL
42	CPPMA	Amazonas	30/08/2009	<i>T. inunguis</i>	M	INT, PUL, TRA	PUL
43	CPPMA	Amazonas	21/01/2013	<i>T. inunguis</i>	F	ADR, BAC, CER, COR, CVX, FIG, INT, LFN, OVA, MED, PUL, RIM, TRO, UTE	ADR, BAC, CER, FIG, LFN, MED, PUL, RIM
44	CPPMA	Amazonas	12/01/2017	<i>T. inunguis</i>	F	BAC, COR, FIG, LFN, PAR, PUL, RIM, TIM	CER, RIM, TIM

(Continua)

Anexo 3 Continuação: Identificação dos sirênios e cetáceos necropsiados e avaliados quanto à infecção por *Brucella* e *Morbillivirus* utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Identificação do animal	Instituição de origem	Local de origem	Data da coleta	Espécie	Sexo	PCR <i>Brucella</i> spp.	Nested-PCR Paramixovírus
45	CPPMA	Amazonas	26/01/2009	<i>T. inunguis</i>	F	CVX, COR, FIG, INT, LFN, PUL, RIM	PUL, RIM
46	CPPMA	Amazonas	23/12/2010	<i>T. inunguis</i>	F	COR, FIG, INT, PAN, PUL, RIM	RIM
47	CPPMA	Amazonas	nd	<i>T. inunguis</i>	F	BAC, COR, FIG, LFN, PUL, OVA, RIM, UTE	BAC, FIG, LFN, PUL, RIM
48	CPPMA	Amazonas	nd	<i>T. inunguis</i>	M	LFN	LFN
49	CPPMA	Amazonas	nd	<i>T. inunguis</i>	F	COR, FIG, RIM	FIG, RIM
50	CPPMA	Amazonas	nd	<i>T. inunguis</i>	M	ADR, COR, FIG, PUL, RIM	FIG, PUL, RIM

nd: não disponível; (*): Amostras com resultado positivo; ADR: glândula adrenal; BAC: baço; COR: coração; CVX: cervix; FIG: fígado; GLM: glândula mamária; INT: intestino; LFN: linfonodo; MED: medula; OVA: ovário; PAN: pâncreas; PAR: glândula parótida; PUL: pulmão; UTE: útero; TIM: timo.

Anexo 4: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella* spp. e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
1	<i>T. inunguis</i>	F	12/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SAN, SGN, SNA, SOR	na
			26/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SAN, SGN, SNA, SOR	na
			ni	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
2	<i>T. inunguis</i>	F	16/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			25/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN	na
			15/08/2012	CPPMA	cativeiro	neg	SGN	na
3	<i>T. inunguis</i>	M	24/01/2013	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			13/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			28/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN	Na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella spp.</i>	PCR Paramixovírus
			21/03/2013	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
4	<i>T. inunguis</i>	F	16/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			25/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
5	<i>T. inunguis</i>	M	16/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			25/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN	na
6	<i>T. inunguis</i>	M	13/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			28/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN	na
7	<i>T. inunguis</i>	M	13/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			28/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN	na
8	<i>T. inunguis</i>	M	27/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
			25/09/2013	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
9	<i>T. inunguis</i>	M	12/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			26/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
10	<i>T. inunguis</i>	F	25/07/2017	CPPMA	cativeiro	na	SNA	SNA
11	<i>T. inunguis</i>	M	13/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			28, 29/07	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
12	<i>T. inunguis</i>	F	16/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			27/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
13	<i>T. inunguis</i>	F	21/03/2013	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			16/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella spp.</i>	PCR Paramixovírus
			27/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SNA	SNA
			13/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
14	<i>T. inunguis</i>	M	28/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			02/08/2017	CPPMA	cativeiro	na	SGN, SNA	SNA
			set/13	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
15	<i>T. inunguis</i>	M	jul/17	CPPMA	cativeiro	neg	SGN	na
			16/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
16	<i>T. inunguis</i>	F	25/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
			25/09/2013	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
17	<i>T. inunguis</i>	F	16/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			25/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella spp.</i>	PCR Paramixovírus
18	<i>T. inunguis</i>	F	16/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			27/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN	na
19	<i>T. inunguis</i>	M	13/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			02/08/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
20	<i>T. inunguis</i>	M	13/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			28/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
21	<i>T. inunguis</i>	F	25/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
22	<i>T. inunguis</i>	F	16/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			18/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
23	<i>T. inunguis</i>	M	28/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			02/08/2017	CPPMA	cativeiro	na	SGN, SNA	SNA

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
24	<i>T. inunguis</i>	M	13/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			28/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
25	<i>T. inunguis</i>	F	16/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
26	<i>T. inunguis</i>	F	25/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
27	<i>T. inunguis</i>	M	26/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
28	<i>T. inunguis</i>	F	jul/17	CPPMA	cativeiro	na	SAN, SGN, SNA, SOR	na
			16/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
29	<i>T. inunguis</i>	M	17/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			26/07/2017	CPPMA	cativeiro	na	SAN, SGN, SNA, SOR	na
30	<i>T. inunguis</i>	M	26/07/2017	CPPMA	cativeiro	na	SGN, SNA	SNA

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
31	<i>T. inunguis</i>	M	25/09/2013	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			17/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			26/07/2017	CPPMA	cativeiro	na	SGN, SNA	SNA
32	<i>T. inunguis</i>	M	24/01/2013	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			18/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			28 e 29/07 e 02/08/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
33	<i>T. inunguis</i>	M	20/03/2013	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			28/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
34	<i>T. inunguis</i>	F	10/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
35	<i>T. inunguis</i>	F	nd	CPPMA	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
36	<i>T. inunguis</i>	F	20/03/2013	CPPMA	cativeiro	neg	na	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella spp.</i>	PCR Paramixovírus
37	<i>T. inunguis</i>	F	20/03/2013	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
38	<i>T. inunguis</i>	M	24/01/2013	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			21/03/2013	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
39	<i>T. inunguis</i>	F	29/08/2015	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			16/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			25/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN	na
40	<i>T. inunguis</i>	M	13/01/2017	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
			28/07/2017	CPPMA	cativeiro	neg	SGN	na
41	<i>T. inunguis</i>	M	nd	CPPMA	cativeiro	neg	na	na
42	<i>T. inunguis</i>		07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	na	na
43	<i>T. inunguis</i>	F	07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
44	<i>T. inunguis</i>	M	06/12/2018	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
45	<i>T. inunguis</i>	F	06/12/2018	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
46	<i>T. inunguis</i>	M	06/12/2018	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
47	<i>T. inunguis</i>	M	07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
48	<i>T. inunguis</i>	M	07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
49	<i>T. inunguis</i>	M	07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
50	<i>T. inunguis</i>	M	07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
51	<i>T. inunguis</i>	M	07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN	na
52	<i>T. inunguis</i>	M	07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
53	<i>T. inunguis</i>	F	06/12/2018	Zoofit	cativeiro	neg	SAN, SGN, SNA, SOR, SOC	na
54	<i>T. inunguis</i>	M	07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
55	<i>T. inunguis</i>	M	06/12/2018	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
56	<i>T. inunguis</i>	M	06/12/2018	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	na
57	<i>T. inunguis</i>	F	06/12/2018	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
58	<i>T. inunguis</i>	F	06/12/2018	Zoofit	cativeiro	neg	SAN, SNA, SOR, SOC	na
59	<i>T. inunguis</i>	F	07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
60	<i>T. inunguis</i>	F	07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
61	<i>T. inunguis</i>	M	07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
62	<i>T. inunguis</i>	M	07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SNA	SNA
63	<i>T. inunguis</i>	M	07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
64	<i>T. inunguis</i>	F	07/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
65	<i>T. inunguis</i>	F	05/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
66	<i>T. inunguis</i>	M	05/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
67	<i>T. inunguis</i>	M	05/12/2016	Zoofit	cativeiro	neg	SGN, SNA	SNA
68	<i>T. manatus</i>	F	27/10/2016	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
69	<i>T. manatus</i>	F	30/10/2016	CMA/ICMBio	reintroduzido	neg	na	na
70	<i>T. manatus</i>	M	08/11/2016	CMA/ICMBio	nativo	na	SGE, SGN, SNA, SOR	SNA
71	<i>T. manatus</i>	F	06/11/2016	CMA/ICMBio	nativa	na	SGN, SNA, SOR	SNA
			11/11/2016	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE, SNA, SOR	na
72	<i>T. manatus</i>		05/08/2017	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE, SOC	na
			05/12/2017	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE, SOC	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
73	<i>T. manatus</i>	M	13/05/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			22/11/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SGE, SOC	na
			18/05/2017	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
			01/09/2017	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE, SOC	na
74	<i>T. manatus</i>	M	15/04/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGN, SNA, SOR	SNA
			11/11/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SGE, SNA, SOR	SNA
			03/12/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE, SOC	na
			19/08/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
75	<i>T. manatus</i>	M	20/08/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			22/11/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SGE, SOC	na
			18/05/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
76	<i>T. manatus</i>	F	30/07/2015	CMA/ICMBio	reintroduzido	neg	na	na
			14/08/2015	CMA/ICMBio	reintroduzido	neg	na	na
			10/07/2017	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SNA, SOC	na
			20/07/2017	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
77	<i>T. manatus</i>	F	08/05/2014	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
			29/05/2015	CMA/ICMBio	reintroduzido	neg	na	na
			29/07/2015	CMA/ICMBio	reintroduzido	neg	na	na
			15/10/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
78	<i>T. manatus</i>	F	06/11/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			17/11/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			18/01/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
78	<i>T. manatus</i>	F	18/05/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	Na
			22/11/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SGE	na
			16/05/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
79	<i>T. manatus</i>	F	07/05/2015	CMA/ICMBio	reintroduzido	neg	na	na
			nd	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
80	<i>T. manatus</i>	F	02/06/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			20/09/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			29/04/2013	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
81	<i>T. manatus</i>	M	10/11/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			14/08/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			08/05/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
81	<i>T. manatus</i>	M	20/06/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	Na
			13/01/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			28/04/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			20/09/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
82	<i>T. manatus</i>	M	19/05/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			18/05/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			26/08/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			01/04/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
83	<i>T. manatus</i>	M	15/04/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGN, SNA, SOR, SLS	SNA
			19/05/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SGE	na
			19/08/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SGE	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
83	<i>T. manatus</i>	M	23/08/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	Na
			23/08/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			07/08	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			15/05/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			08/05/2013	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
84	<i>T. manatus</i>	F	17/06/2013	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			28/08/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			15/10/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			22/04/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SNA, SOR, SLS	SNA
			18/09/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			27/09/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
84	<i>T. manatus</i>	F	21/07/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	Na
			26/08/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SGE	na
			21/05/2013	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			14/06/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			10/02/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			18/02/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
85	<i>T. manatus</i>	M	12/03/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			10/08/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			19/11/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			18/05/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			18/05/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SGE	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
85	<i>T. manatus</i>	M	27/02/2019	FMA	reintroduzido	na	SGE, SAN, SGN, SNA, SOC	Na
			03/10/2003	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			13/05/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
86	<i>T. manatus</i>	M	19/08/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SNA	na
			23/08/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			10/02	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			07/08/2013	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
			08/05/2014	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
87	<i>T. manatus</i>	F	19/10/2014	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
			08/05/2015	CMA/ICMBio	reintroduzido	neg	na	na
			29/06/2015	CMA/ICMBio	reintroduzido	neg	na	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
88	<i>T. manatus</i>	F	09/08/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			06/12/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SGE	na
			16/05/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			26/02/2019	FMA	reintroduzido	na	SGE, SAN, SGN, SNA, SOR	na
			12/02/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
89	<i>T. manatus</i>	F	20/08/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			05/08/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			06/12/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			16/05/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
90	<i>T. manatus</i>	F	06/12/2011	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			12/02/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
90	<i>T. manatus</i>	F	20/08/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	Na
			05/08/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			06/12/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			16/05/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			17/06/2013	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			13/05/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
91	<i>T. manatus</i>	F	19/08/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			18/11/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			20/06/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			25/04/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			29/05/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
92	<i>T. manatus</i>	F	21/03/2013	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
			30/04/2013	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
			09/06/2014	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
			05/08/2015	CMA/ICMBio	reintroduzido	neg	na	na
			20/08/2015	CMA/ICMBio	reintroduzido	neg	na	na
			05/08/2016	CMA/ICMBio	reintroduzido	neg	na	na
			03/03/2017	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
			28/04/2017	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
			20/09/2017	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
93	<i>T. manatus</i>	F	12/02/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			08/05/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
93	<i>T. manatus</i>	F	06/12/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SGE	Na
			05/08/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			30/04/2013	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			02/06/2014	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
94	<i>T. manatus</i>	M	08/05/2015	CMA/ICMBio	reintroduzido	neg	na	na
			17/06/2016	CMA/ICMBio	reintroduzido	neg	na	na
			13/01/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			20/09/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			29/04/2013	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
95	<i>T. manatus</i>	F	22/04/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGN, SNA	na
			18/08/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
95	<i>T. manatus</i>	F	05/08/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	Na
			06/12/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SGE	na
			04/04/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			16/05/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
96	<i>T. manatus</i>	F	30/10/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SGE	na
			12/02/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			05/07/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
97	<i>T. manatus</i>	F	05/08/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			22/04/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGN, SOR, SLS	SNA
98	<i>T. manatus</i>	M	05/08/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
			27/10/2016	CMA/ICMBio	nativo	neg	na	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella* spp. e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
99	<i>T. manatus</i>	M	29/10/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
100	<i>T. manatus</i>	F	10/11/2015	CMA/ICMBio	nativo	neg	na	na
101	<i>T. manatus</i>	F	14/08/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	na	na
102	<i>T. manatus</i>	F	12/02/2014	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			22/04/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SGN, SNA, SOR, SLS	SNA
103	<i>T. manatus</i>	F	29/04/2013	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			22/04/2015	CMA/ICMBio	cativeiro	neg	SNA, SLS	SNA
104	<i>T. manatus</i>	F	20/09/2017	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
105	<i>T. manatus</i>	M	20/09/2017	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
106	<i>T. manatus</i>	nd	nd	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
107	<i>T. manatus</i>	F	30/10/2016	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
			18/12/2014	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
108	<i>T. manatus</i>	F	10/01/2017	FMA	reintroduzido	na	SGN, SNA, SOR, SLS	SNA
			15/12/2017	FMA	reintroduzido	neg	SGN, SNA, SOR	SNA
109	<i>T. manatus</i>	F	11/05/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			17/12/2014	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
110	<i>T. manatus</i>	F	13/01/2017	FMA	reintroduzido	na	SGN, SNA, SOR	SNA
			02/02/2018	FMA	reintroduzido	na	SGN, SNA, SOR	SNA
			19/03/2014	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
111	<i>T. manatus</i>	F	09/09/2014	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
			10/08/2017	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
			20/09/2017	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na

(Continua)

Anexo 4 Continuação: Sirênios vivos de vida livre e de cativeiro amostrados e analisados quanto à infecção por *Brucella spp.* e *Morbillivirus*.

Identificação do animal	Espécie	Sexo	Data da amostragem	Instituição responsável pela amostragem	Local de origem	AAT	PCR <i>Brucella</i> spp.	PCR Paramixovírus
112	<i>T. manatus</i>	F	16/05/2013	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			31/03/2014	CMA/ICMBio	reintroduzido	na	SGE	na
			10/01/2017	FMA	reintroduzido	na	SGN, SNA, SOR	SNA
			18/10/2017	FMA	reintroduzido	na	SGN, SNA, SOR	SNA
113	<i>T. manatus</i>	F	16/mai	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			12/01/2017	FMA	reintroduzido	na	SGN, SNA, SOR	SNA
			17/10/2017	FMA	reintroduzido	na	SGN, SNA, SOR	SNA
114	<i>T. manatus</i>	F	30/03/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
			20/09/2017	CMA/ICMBio	cativeiro	na	SGE	na
115	<i>T. manatus</i>		19/10/2017	FMA	reintroduzido	na	SGN, SNA, SOR	SNA

na: não analisado; nd: não disponível; neg: resultado negativo; AAT: teste do antígeno acidificado tamponado; SGE: amostra de sangue; SAN: amostra de *swab* anal; SGN: amostra de *swab* genital; SNA: amostra de *swab* nasal; SOR: amostra de *swab* oral; SLS: amostra de *swab* de lesão cutânea.

Anexo 5: protocolo para extração de DNA de amostras de *swabs* genitais e nasais

1. Transferir um volume 200 μ L da suspensão de *swabs* para um microtubo;
2. Acrescentar, à suspensão de 200 μ L, obtida conforme o item 2.4, o tampão de lise composto por: 10 mM de Tris-HCl; 25 mM de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA); 100 mM de cloreto de sódio (NaCl); 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,8 mg/ml de proteinase K, num volume final de 500 μ L;
3. Homogeneizar em vórtex;
4. Incubar a 37° C *overnight*;
5. Centrifugar em *spin*;
6. Acrescentar 500 μ L de solução de fenol:clorofórmio (1:1);
7. Homogeneizar em vórtex;
8. Transferir o sobrenadante (400 μ L) para um novo microtubo;
9. Acrescentar 400 μ L de clorofórmio e homogeneizar em vórtex;
10. Centrifugar a 13.000 x g durante 5 minutos;
11. Transferir o sobrenadante (300 μ L) para um novo microtubo;
12. Acrescentar 2 μ L de glicogênio e 302 μ L álcool isopropílico e incubar a -20° C durante 30 minutos;
13. Centrifugar a 13.000 x g durante 30 minutos;
14. Descartar o sobrenadante por inversão;
15. Acrescentar 1 mL de etanol 70% e homogeneizar por inversão;
16. Centrifugar a 13.000 x g durante 30 minutos;
17. Descartar o sobrenadante por inversão e secar o sedimento em banho seco a 56° C;
18. Ressuspender o sedimento em 30 μ L de tampão TE e incubado a 56° C durante 20 minutos;
19. Congelar as amostras a -20° C até a realização da reação de amplificação.