PATRICK MATHEWS DELGADO

**Detecção sorológica de infecção por *Toxoplasma gondii* e *Leptospira* spp.
em peixes-bois (*Trichechus inunguis*) de dois centros de preservação
da Amazônia brasileira**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

PATRICK MATHEWS DELGADO

Detecção sorológica de infecção por *Toxoplasma gondii* e *Leptospira* spp. em peixes-bois (*Trichechus inunguis*) de dois centros de preservação da Amazônia brasileira

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Solange Maria Gennari

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Delgado, Patrick Mathews.

Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* e *Leptospira* spp. em peixes-bois (*Trichechus inunguis*) de dois centros de preservação da Amazônia brasileira / Patrick Mathews Delgado. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Solange Maria Gennari.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Protozoários de animais domésticos e silvestres.

Versão do título para o inglês: Antibodies anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Leptospira* spp. in manatees (*Trichechus inunguis*) from two centers of preservation of the Brazilian Amazon.

Descritores: 1. *Toxoplasma gondii* 2. *Leptospira* spp. 3. Peixes-bois da Amazônia 4. *Trichechus inunguis* I. Gennari, Solange Maria II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0202/2010

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Candidato (a): PATRICK MATHEWS DELGADO

Título da Dissertação: Detecção sorológica de Infecção por *Toxoplasma gondii* e *Leptospiras* spp. em peixes-bois (*Trichechus inunguis*) de dois centros de preservação da Amazônia brasileira

Orientador: Solange Maria Gennari.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Presidente(a): Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Aos meus pais, Carlos e Teresa, pelo amor, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Sem vocês, nada disso seria possível.

Aos meus irmãos pelo carinho, amizade, ajuda e paciência.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Solange Maria Gennari pela oportunidade, confiança e orientação.

Ao programa de pós graduação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), pela grande oportunidade de realizar este mestrado.

À Wilma e Ângela, secretárias da pós-graduação do Departamento de Parasitologia do ICB-USP pela dedicação e carinho.

A todos os professores, técnicos, funcionários, pos-graduandos e estagiários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da USP que colaboraram direta o indiretamente para a realização desse estudo.

Às secretárias do VPS e ao Danival por toda ajuda necessária.

A todos os pesquisadores e funcionários do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e do Centro de Conservação e Preservação de Mamíferos Aquáticos que colaboraram para a realização desse estudo.

Aos amigos Danilo Saraiva, Gislene Rocha e Guacyara Tenório Cavalcante pela grande amizade, carinho, paciência, dicas, apoio e por todos os momentos felizes que tive no Brasil. Sem vocês a jornada seria muito mais difícil.

A meus tios Juan, Gabriela, Cesar e prima socorro pelo apoio incondicional, carinho e estima.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado.

*“Não há nada impossível,
porque os sonhos de ontem são as
esperanças de hoje e podem
converter-se em realidade amanhã”*

Mario Vargas Llosa

RESUMO

MATHEWS, P. D. **Detecção sorológica de infecção por *Toxoplasma gondii* e *Leptospira* spp. em peixes-bois (*Trichechus inunguis*) de dois centros de preservação da Amazônia brasileira.** 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Toxoplasma gondii e *Leptospira* spp. estão amplamente distribuídos mundialmente e podem causar mortalidade em muitas espécies de animais domésticos e silvestres. Recentemente *T. gondii* e *Leptospira* spp. foram reconhecidos por causar mortalidades em mamíferos marinhos em diversas regiões do mundo. No entanto, ainda não há relato de exposição natural de *T. gondii* e *Leptospira* spp. em peixes-bois da Bacia Amazônica. O presente estudo teve como objetivo avaliar a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Leptospira* spp. em peixes-bois (*Trichechus inunguis*) da Amazônia Brasileira amostrados em cativeiro. Amostras sanguíneas de 74 peixes-bois foram colhidas de unidades de resgate do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e do Centro de Pesquisas e Conservação de Mamíferos Aquáticos (CPPMA), localizados em Manaus e Balbina, respectivamente. Para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, soros foram diluídas 1:25, 1:50 e 1:500 e a presença de anticorpos foi determinada pela técnica de aglutinação modificada. Para *Leptospira* spp. soros foram diluídos 1:100 e testados frente a 24 sorovares da bactéria, e a presença de anticorpos foi determinada pela técnica de soroaglutinação microscópica. Os soros reagentes na triagem foram novamente testados para a determinação do título final efetuando-se diluições seriadas em escala geométrica de razão dois. Dos 74 peixes-bois analisados 29 (39,2%) foram positivos ao *T. gondii* apresentando todos os animais título de 25. Para *Leptospira* spp. 23 (31,1%) das 74 amostras foram reagentes para quatro sorovares com títulos variando de 100 a 1600. Os principais sorovares reagentes foram: Patoc (21/23 positivos), Castellonis (2/23), Icterohaemorrhagiae (1/23) e Butembo (1/23). Houve coaglutinação dos sorovares Patoc, Castellonis e Icterohaemorrhagiae (títulos 100 e 200) em um animal. Anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*Leptospira* spp. encontram-se presentes nos peixes-bois mantidos em cativeiro nos dois centros de pesquisa com uma maior prevalência no INPA. Em relação ao total de animais examinados, a idade e o sexo não apresentaram associação ($p > 0,05$) com a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii*, entretanto em relação às leptospiros associação foi observada ($p < 0,05$), com maior prevalência nos animais adultos. Este é o primeiro relato da ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* e *Leptospira* spp. em peixes-bois da Amazônia brasileira.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. *Leptospira* spp. Peixes-bois da Amazônia. *Trichechus inunguis*.

ABSTRACT

MATHEWS, P. D. Sorological detection of infection with *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. in manatees (*Trichechus inunguis*) from two centers of preservation of the Brazilian Amazon. 2010. 68 p. Master thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Toxoplasma gondii and *Leptospira* spp. are widely distributed worldwide and are reported to cause mortality in many species of wild and domestic animals. Recently, *T. gondii* and *Leptospira* spp. were recognized to cause mortalities in marine mammals in different regions of the world. However, there is no report of natural exposure to *T. gondii* and *Leptospira* spp. In manatees in the Amazon Basin. This study aimed to evaluate the prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. Antibodies in manatees (*Trichechus inunguis*) sampled in captivity, in the Brazilian Amazon. Blood samples from 74 manatees were taken from rescue units, *Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia* (INPA) and *Centro de Pesquisas e Conservação de Mamíferos Aquáticos* (CPPMA), located in Manaus and Balbina, respectively. For detecting antibodies anti-*T. gondii*, sera were diluted 1:25, 1:50 and 1:500 and presence of antibody was determined by the modified agglutination test. To *Leptospira* spp. sera were diluted 1:100 and tested against the bacteria with 27 serovars and presence of antibody was determined by microscopic agglutination test. Positive sera were tested again to determine the final titer. Of the 74 manatees analyzed 29 (39.2%) were positive to *T. gondii* with titer of 25. For *Leptospira* spp. 23 (31.1%) samples were positive for four serotypes with titers ranging from 100 to 1600. The serovars that reacted with the samples were Patoc (21/23 positive), Castellonis (2/23), Icterohaemorrhagiae (1/23) and Butembo (1/23). Coagglutination of serovars Patoc, Castellonis and Icterohaemorrhagiae (titles 100 and 200) was observed in one animal (n° 51). Antibodies to *T. gondii* and *Leptospira* spp. are present in manatees in captivity in the two research centers with higher prevalence in INPA. In relation to all animals examined, the age and sex were not associated ($p > 0.05$) with the prevalence of anti-*T. gondii*, however for the *Leptospira* association was observed ($p < 0.05$), with higher prevalence in the adult animals. This is the first report of the occurrence of *T. gondii* and *Leptospira* spp. antibodies in manatees in the Brazilian Amazon.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. *Leptospira* spp. Amazon manatee. *Trichechus inunguis*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo evolutivo do <i>Toxoplasma gondii</i>	19
Quadro 1 - Ocorrência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em mamíferos aquáticos em diferentes países.....	23
Quadro 2 - Ocorrência de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. em mamíferos aquáticos em diferentes regiões mediante a técnica da soroaglutinação microscópica com pontodecorte1:10.....	29
Figura 2 - Peixe-boi da Amazônia, <i>Trichechus inunguis</i>	30
Figura 3 - Mapa da distribuição do Peixe-boi da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) no Brasil e do peixe-boi marinho <i>Trichechus manatus</i> , no Brasil e nas Américas. Fonte: Souza-Lima (1999).....	32
Figura 4 - Vista lateral dos tanques do Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, que alojam os peixes-bois.....	36
Figura 5 - Vista superior de um tanque do Centro de Preservação e Pesquisas de Mamíferos Aquáticos (CPPMA), Balbina, AM, onde são mantidos os peixes-bois.....	36
Quadro 3 - Número de peixes-bois amostrados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e no Centro de Pesquisa e Preservação de Mamíferos Aquáticos (CPPMA) segundo o sexo e a idade dos animais, Amazonas, 2010.....	37
Quadro 4 - Antígenos utilizados na Técnica de Soroaglutinação Microscópica. São Paulo, 2010.....	41

Gráfico 1 - Prevalência de anticorpos anti- <i>T.gondii</i> em peixes-bois da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) segundo local de coleta, sexo e faixa etária.....	43
Gráfico 2 - Prevalência de anticorpos anti- <i>T.gondii</i> em peixes-bois da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) mantidos no INPA segundo sexo e faixa etária.....	44
Gráfico 3 - Prevalência de anticorpos anti- <i>T.gondii</i> em peixes-bois da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) mantidos no CPPMA segundo sexo e faixa etária.....	44
Gráfico 4 - Prevalência de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. em peixes-bois da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) segundo local de coleta, sexo e faixa etária.....	47
Gráfico 5 - Prevalência de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. em peixes-bois da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) mantidos no INPA segundo sexo e faixa etária.....	48
Gráfico 6 - Prevalência de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. em peixes-bois da Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>) mantidos no CPPMA segundo sexo e faixa etária.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Associação entre a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em peixes-bois e as variáveis local de coleta, idade e sexo42

Tabela 2 - Amostras de soros de peixes-bois (*Trichechus inunguis*) positivas para sorovares de *Leptospira* por sexo, idade e local de coleta e título.....46

Tabela 3 - Associação entre a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em peixes-bois (*Trichechus inunguis*) e as variáveis local de coleta, sexo e idade.....47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
®	marca registrada
µg	micrograma(s)
µL	microlitro(s)
µm	micrometro
d	densidade
EUA	Estados Unidos da América
<i>et al.</i>	e outros; e colaboradores
g	grama(s)
Kg	kilograma
M	Molar
Min	minuto
mL	mililitro(s)
mM	milimolar
Na ₂ CO ₃	carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio dibásico anidro
NaCl	cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	fosfato de sódio monobásico anidro
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
°C	grau Celsius
p/v	peso/volume
pH	concentração de hidrogênio iônico
PM	peso molecular
Seg	segundo
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUCAO E REVISAO DE LITERATURA.....	16
2 OBJETIVOS.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Locais do estudo.....	35
3.2 Animais.....	37
3.3 Colheita de sangue.....	37
3.4. Exame sorológico para detecção de anticorpos IgG anti-<i>T. gondii</i>.....	38
3.5. Exame sorológico para detecção de anticorpos anti-<i>Leptospira</i> spp.....	39
3.6. Análise estatística.....	40
4 RESULTADOS	42
4.1 Sorologia para detecção de anticorpos anti- <i>T.gondii</i>.....	42
4.2 Sorologia para detecção de anticorpos anti-<i>Leptospira</i> spp.....	45
5 DISCUSSÃO	49
5.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	49
5.2 <i>Leptospira</i> spp.....	52
6 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A saúde animal é um tema importante na criação de animais assim como na conservação da vida selvagem. Tanto no caso de animais selvagens como no de animais domésticos o impacto que as doenças podem ter nas populações animais e o modo como as transmissões ocorrem entre os domésticos e os selvagens é uma preocupação constante. A importância de se entender a ecologia dos vetores, os reservatórios e os hospedeiros, vem sendo reconhecida desde o início do século XX (MILLS e CHILDS, 1998; BENGIS; KOCK; FISHER, 2002).

O estudo de doenças em animais selvagens é um tópico de grande importância, tanto que a Organização Internacional de Epizootias (OIE) publicou, em 2002, um número especial do “Scientific and Technical Review” inteiramente voltado para as doenças infecciosas de animais selvagens, com ênfase no diagnóstico e controle.

Entre os fatores que têm favorecido o contato entre animais selvagens, domésticos e o homem, estão o acelerado crescimento populacional humano juntamente com a destruição e fragmentação de habitats. Desse modo, as criações de novas oportunidades de contato e potenciais transmissões de doenças são consequência do crescimento da atividade de criação de animais domésticos e da urbanização, introdução de novas espécies e translocação de animais (SCHRAG e WIERNER, 1995).

A transmissão de doenças infecciosas entre animais domésticos e selvagens pode ocorrer de diversas maneiras e é dependente de elementos espaciais e temporais. Esses elementos podem variar dependendo do agente infeccioso envolvido e/ou da presença de vetor no ciclo epidemiológico. Desse modo, além do contato entre animais domésticos ou selvagens infectados com animais suscetíveis, são importantes os fatores relacionados ao clima e as flutuações populacionais que determinam tanto o tamanho das populações hospedeiras como a abundância dos vetores. Nesse sentido, em animais de vida livre há doenças que, transmitidas por contacto direto ou água contaminada, podem aumentar sua ocorrência em período de seca, quando há um maior contato entre os mesmos no momento em que buscam as fontes de água remanescentes (BENGIS; KOCK; FISHER, 2002).

À medida que as populações de animais selvagens ficam mais limitadas a parques, reservas e centros de preservação, devido à destruição de seus habitats naturais, há um adensamento de suas populações. Esse aumento de densidade favorece a transmissão de patógenos entre os animais selvagens e facilita, também, a troca de patógenos com as

populações de animais domésticos que são criados na periferia desses parques, reservas e cativeiros. Nesse sentido, tem-se, como exemplo, a brucelose em bisões do parque de Yellowstone nos Estados Unidos que teve como origem as criações de bovinos existentes no entorno do parque (DOBSON e MEAGHER, 1996). Outros exemplos semelhantes já foram descritos com doenças tais como: cinomose, tuberculose bovina, peste suína africana e febre do Nilo (BENGIS; KOCK; FISHER, 2002).

A ocorrência destas zoonoses geralmente acompanha as incursões dos humanos e seus animais domésticos em áreas naturais remotas onde agentes de doenças têm existido há muito tempo em associação com animais selvagens (FIELD et al., 2001).

Os animais selvagens podem ser reservatórios das doenças que fazem parte da lista de doenças da OIE, bem como de outras importantes enfermidades que infectam animais domésticos e o próprio homem colocando em risco o sucesso de eventuais programas de controle dessas enfermidades que não contemplem a avaliação das populações de animais silvestres. Conseqüentemente, o estudo das doenças de animais selvagens e a dinâmica destas são importantes para a saúde pública e para a economia de um país (MORNER et al., 2002). Além das implicações diretas das enfermidades de animais selvagens na economia e 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 doenças, de mudanças climáticas, de alteração do habitat ou de poluição local (TABOR, 2002).

No Brasil, apesar da existência de uma grande variedade de espécies animais nativas, estudos de doenças em animais selvagens ainda são muito escassos. Dentre as importantes enfermidades infecciosas existentes encontram-se a toxoplasmose e a leptospirose, ambas zoonoses com ampla distribuição geográfica. Estas enfermidades afetam o homem e uma grande variedade de animais domésticos e selvagens causando severos problemas de saúde pública e saúde animal, além de perdas econômicas na pecuária (BLENDEN, 1986).

A toxoplasmose é uma doença causada pelo *Toxoplasma gondii* um protozoário intracelular obrigatório com distribuição geográfica mundial e capacidade de infectar os animais de sangue quente, incluindo aves, mamíferos silvestres e domésticos e o homem (BOOTHROYD et al., 1998). Os primeiros relatos da doença ocorreram em 1909, quando o parasita foi descoberto em um pequeno roedor africano (*Ctenodactylus gondi*) em Túnis, no norte da África por Nicolle e Manceieux (TENTER e JOHNSON, 1997). Na mesma época, Splendore descreveu o mesmo parasita em um coelho de laboratório na cidade de São Paulo, Brasil (DUBEY, 2010).

A patogenicidade da infecção pelo *T. gondii* em diferentes espécies varia muito, sendo que os mais vulneráveis, nos quais a infecção aguda geralmente é fatal, são os marsupiais australianos como os cangurus (*Macropus fuliginosus*), os coalas (*Phascolarctos cinereus*), os macacos do Novo Mundo e os pingüins (INNES, 1997). Aliado a notável capacidade do *T. gondii* de infectar qualquer célula nucleada, estas características explicariam a ampla difusão do parasita no mundo. Estima-se que até um terço da população humana tenha sido exposta ao *T. gondii* (JACKSON e HUTCHISON, 1989; ASHBURN, 1992; DUBEY, 1998) e sua patogenicidade está estreitamente relacionada à virulência da amostra e à espécie hospedeira.

Toxoplasma gondii apresenta um ciclo de vida facultativo heteroxeno, as três formas primárias para sua difusão são: a transmissão congênita, a ingestão de tecidos animais contendo cistos infectantes e a ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos esporulados.

Atualmente, não há métodos que determinem se um hospedeiro se infectou pela ingestão de cistos teciduais ou de oocistos esporulados (DUBEY, 1994; DUBEY, 2001; BOOTHROYD e GRIGG, 2002). Os felídeos, incluindo os Felidae selvagens, além de serem hospedeiros intermediários, são os únicos animais reconhecidos como hospedeiros definitivos do *T. gondii* e desempenham um papel fundamental na epidemiologia da toxoplasmose, pois excretam os oocistos nas fezes (DUBEY e BEATTIE, 1988; TENTER et al., 2000). Além dos oocistos, outras formas de vida existentes nas fases aguda e crônica da infecção (taquizoítos e bradizoítos, respectivamente) podem ser transmitidos ao hospedeiro susceptível, ampliando o risco de infecção para o homem e outros animais. A figura 1 ilustra o ciclo evolutivo do *T.gondii*.

Após a ingestão pelo hospedeiro, a parede externa de cistos ou oocistos é rompida por degradação enzimática e as formas infectantes (bradizoítos ou esporozoítos) são liberadas no lume intestinal. No intestino, elas rapidamente invadem as células e se diferenciam em taquizoítos, que se reproduzem assexuadamente por endodiogenia (TENTER et al., 2000). Os taquizoítos caracterizam a fase aguda da infecção (DUBEY et al., 1970) e representam um problema para a saúde humana e de algumas espécies de animais, pois são as formas transmitidas verticalmente na gestação.

Figura 1 – Ciclo evolutivo do *Toxoplasma gondii*
 Fonte: Adaptado de Gennari e Nishi (2010).

Os cistos teciduais, que ocorrem na fase crônica da doença, são um acúmulo de *T. gondii* sob a forma de bradizoítos, estágios que se multiplicam lentamente e são envolvidos por uma parede cística. Esses cistos se formam com o início da resposta imune do hospedeiro, sendo uma forma de proteção do parasito. São encontrados principalmente no cérebro, musculatura cardíaca e esquelética e retina, pois nesses locais o acesso de anticorpos é restrito a um pequeno número de células. Além desses locais, os cistos podem ser encontrados em outros órgãos e tecidos do hospedeiro, como fígado, pulmões e rins, persistindo por longos períodos, provavelmente por toda a vida do hospedeiro (DUBEY e FRENKEL, 1976; DUBEY e BEATTIE, 1988; TENTER et al., 2000). Apesar de predominarem na fase crônica, os cistos são formados no início da infecção. Em camundongos já foi observado a formação de cistos oito dias pós-infecção, independentemente do estágio infectante e da via de inoculação (DUBEY et al., 1997; DUBEY e FRENKEL, 1998).

Normalmente, *T. gondii* parasita o hospedeiro sem causar sinais clínicos. Os maiores problemas clínicos da toxoplasmose referem-se à infecção primária durante a gestação, que pode resultar na infecção congênita do feto, levando a quadros neurológicos e oculares em crianças, assim como abortamento e mortalidade neonatal em ovinos, caprinos e suínos, causando perdas econômicas. Destaca-se também a reativação de infecções latentes em

indivíduos imunossuprimidos, acarretando quadros clínicos severos e às vezes fatais (DUBEY e BEATTIE, 1988; LÜDER e GROSS, 1998; TENTER et al., 2000).

A infecção na população humana, avaliada por métodos sorológicos, atinge de 30 a 70%, dependendo da população amostrada e da técnica utilizada (DUBEY e BEATTIE, 1988). Em vários países da América Latina, a soroprevalência de infecção pelo *T. gondii* é alta e está entre 51 a 72% (TENTER et al., 2000). No Brasil, a soroprevalência em humanos tem sido determinada na faixa de 50% a 80% (CANTOS et al., 2000). No Recife essa taxa varia de 64% a 79% (COELHO et al., 2003); no Rio de Janeiro foi observada uma soroprevalência de 79%; em Manaus, 71%; em São Paulo/SP, 68% e entre indígenas brasileiros do estado de Mato Grosso, a ocorrência variou de 52% a 65% (BARUZZI, 1970; AMENDOEIRA et al., 1999; SOBRAL et al., 2005).

Nos centros urbanos a infecção pelo *T. gondii* está associada a fatores sócio-culturais e hábitos alimentares da população, entretanto a manutenção do parasito na natureza envolve diversas espécies animais que agem como hospedeiros intermediários do agente.

Rotineiramente o diagnóstico da infecção pelo *T. gondii* é firmado por meio de testes sorológicos para a detecção de anticorpos específicos. São vários os testes disponíveis, sendo que na medicina veterinária a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste de aglutinação modificado (MAT) são testes amplamente utilizados.

Quando é possível a obtenção de fragmentos de tecidos para a pesquisa do parasito, são realizados os ensaios biológicos em camundongos que fornecem informações quanto às características biológicas da amostra de *T. gondii*. O ensaio biológico de amostras de tecidos em camundongos é a prova de eleição para a detecção e isolamento do parasito. Os órgãos mais freqüentemente utilizados são o coração, os pulmões, o baço e o cérebro. As amostras virulentas de *T. gondii* são letais aos camundongos, induzem infecção aguda sendo possível identificar grande quantidade de taquizoítos nos pulmões e cérebro nos primeiros dias pós-infecção, quando parte desses animais vem a óbito. As amostras avirulentas produzem infecção crônica, sendo observados cistos no cérebro e produção de anticorpos específicos (DUBEY e BEATTIE, 1988).

A patogenicidade do *T. gondii* está estreitamente relacionada à virulência da amostra e à espécie hospedeira. O camundongo (*Mus musculus*) tem sido utilizado preferencialmente como modelo animal experimental da toxoplasmose. As amostras de *T. gondii* variam em sua patogenicidade para os camundongos, sendo altamente virulentas, ou não virulentas, originando infecções crônicas. Essas diferenças podem ser particularmente percebidas no primeiro isolamento, uma vez que a patogenicidade pode ser alterada por passagens repetidas

no mesmo hospedeiro. A virulência em camundongos é normalmente determinada pela morbidade e mortalidade causada pelas amostras (KAUFMAN et al., 1959; DUBEY e BEATTIE, 1988; SAEIJ et al., 2005).

Nos primeiros estudos de genotipagem de *T. gondii*, foi observado que mesmo diferindo em algumas propriedades biológicas, as amostras conhecidas foram similares antigenicamente, morfológicamente e na sua capacidade de infectar uma variedade de hospedeiros (SIBLEY e BOOTHROYD, 1992). Apesar de sua distribuição cosmopolita, *T. gondii* apresentou baixa variação genética quando diferentes isolados foram analisados por polimorfismo do comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição – RFLP (CRISTINA et al., 1991; SIBLEY e BOOTHROYD, 1992) ou marcadores isoenzimáticos (DARDE et al., 1992) que encontraram, nessas amostras, uma estrutura populacional altamente clonal (HOWE e SIBLEY, 1995). Modelos de evolução clonal na população são constituídos por organismos que geram progênie idêntica ou quase idêntica, de forma que os genótipos se propagam pelas gerações e são estáveis por longos períodos, sendo que as modificações genótípicas são mínimas (SOARES, 2004).

Toxoplasma gondii isolado de humanos e de animais da Europa e América do Norte foi classificado em três linhagens genéticas – Tipo I, II e III (DARDE et al., 1992; HOWE e SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002). Entretanto, recentes estudos em isolados de animais ou humanos em regiões da América Central e do Sul, em especial, revelaram grande variabilidade genética, diferindo do que já havia sido observado (AJZENBERG et al., 2004; LEHMAN et al., 2004), demonstrando que isolados de *T. gondii* dessas regiões são geneticamente diferentes daqueles da América do Norte e da Europa (LEHMANN et al., 2004, 2006; FERREIRA et al., 2006; KHAN et al., 2005, 2006; SU et al., 2006; DUBEY et al., 2007).

Pena et al. (2008) genotiparam 46 isolados de gatos do estado de São Paulo, Brasil, pela PRC-RFLP *multilocus* e compararam com outros isolados brasileiros de origem animal também analisados pela mesma metodologia. Descreveram quatro linhagens mais comuns no Brasil, denominadas Tipo Br I, Br II, Br III e Br IV, concluindo que a população de *T. gondii* no Brasil é bastante diversificada com poucas linhagens clonais estabelecidas nas diferentes áreas geográficas onde estudos já foram feitos.

Por outro lado, pouco se sabe sobre a importância da transmissão horizontal do *T. gondii* entre diferentes espécies de hospedeiros, a importância dos reservatórios do parasita na natureza e do impacto epidemiológico de diferentes espécies causando infecção ou doença em seres humanos. Assim mesmo, as pesquisas sobre a distribuição de *T. gondii* em animais

silvestres são geralmente restritas ao ambiente terrestre (DAN FORMAN et al., 2009). Mais recentemente foi demonstrado a presença do *T. gondii* no ambiente aquático (DUBEY et al., 2009) e este patógeno foi associado a casos de meningoencefalite (DUBEY et al., 2003), má formação encefálica (MILLER et al., 2008) e abortamento em uma variedade de mamíferos aquáticos, com significantes índices de morbidade e mortalidade (ARKUSH et al., 2003).

A presença de anticorpos anti-*T. gondii* foi relatada por Lambourn et al. (2001) em focas (*Phoca vitulina*) nos Estados Unidos. Peixes-bois marinhos do gênero *Trichechus manatus* foram encontrados soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii* no Brasil (SILVA et al., 2001). Na Espanha e Estados Unidos golfinhos do gênero *Stenella coeruleoalba*, *Delphinus delphis*, *Tursiops truncatus* e *Phocoena phocoena* (RESENDES et al., 2002; CABEZÓN et al., 2004; DUBEY et al., 2008) estavam soropositivos ao coccídio e na Califórnia, outros mamíferos aquáticos, dos gêneros *Enhydra lutris*, *Phoca vitulina*, *Phoca hispida* e *Zalophus californianus* (MILLER et al., 2002a; DUBEY et al., 2003) foram diagnosticados positivos ao agente pela sorologia. No Japão anticorpos foram observados em cetáceos silvestres e de cativeiro *Tursiops truncatus* e *Orcinus orca* (MURATA et al., 2004), no ártico em morsas, *Odobenus rosmarus* e na Rússia em golfinhos do gênero *Delphinapterus leucas* e *Tursiops truncatus* (ALEKSEEV et al., 2009).

O Quadro 1 apresenta os valores de ocorrência de anticorpos anti-*T.gondii* encontrados em mamíferos aquáticos em estudos realizados em diferentes países.

Toxoplasma gondii foi relatado ser letal para algumas espécies de mamíferos aquáticos e estes animais podem servir como sentinelas de contaminação de oocistos de *T. gondii* no ambiente em que vivem.

A toxoplasmose congênita foi diagnosticada em golfinhos, *Tursiops aduncus* no Pacífico (JARDINE e DUBEY, 2002; YOSHITAKA et al., 2005) e em lontras, *Enhydra lutris nereis* na Bahia de Monterrey (MILLER et al., 2008).

Quadro 1 – Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mamíferos aquáticos em diferentes países.

País	Nº de Examinados	Positivos (%)	Teste sorológico	Ponto de corte	Referência
Brasil	12	8,3	LAT	25	Silva et al., 2001
Canadá	34	9	MAT	25	Measures et al., 2004
Espanha	7	57,1	MAT	25	Cabezón et al., 2004
EUA (Califórnia)	80	36	IFAT	320	Miller et al., 2002
EUA (Alasca)	53	5,6	MAT	25	Dubey et al., 2003
EUA (Flórida)	47	100	MAT	25	Dubey et al., 2003
EUA (Havaí)	117	1,7	MAT	25	Aguirre et al., 2007
EUA (Washington)	10	100	MAT	25	Sundar et al., 2008
Japão	59	10,1	IHAT	64	Murata et al., 2004
Japão (Ilha Salomão)	58	13,7	LAT	64	Omata et al., 2005
Reino Unido	21	28,6	DT	NS	Forma et al., 2007
Rússia	189	13,8	ELISA	NS	Alekseev et al., 2008

IFAT: teste de imunofluorescência indireta; MAT: teste de aglutinação modificado; LAT: teste de aglutinação em látex; IHAT: teste de hemaglutinação indireta; DT: dye test (teste de corante); ELISA.

Toxoplasma gondii já foi diagnosticado, por meio de exame histopatológico, em elefante-marinho (*Mirounga angustirostris*) da Califórnia (DUBEY; LIPSCOMB; MENSE, 2004) e em foca-monge (*Monachus schauinslandi*) do Havaí (HONNOLD et al., 2005) e em golfinhos do gênero *Sotalia guianensis* no Brasil (BANDOLI e OLIVEIRA, 1977; DOMINGO et al., 1992). Recentemente *T. gondii* foi reconhecido como causa de encefalite em animais marinhos, particularmente em lontras (*Enhydra lutris nereis*), na Califórnia, onde anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em 42% de 116 lontras vivas e em 62% de 107 lontras encontradas mortas (MILLER et al., 2002b). O coccídio também foi diagnosticado causando encefalite em peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) na Flórida (BUERGELT e BONDE, 1983) e em baleia branca (*Delphinapterus leuca*) no Canadá (MIKAELIAN et al., 2000).

Dubey et al. (2009) isolaram *T. gondii* de mamíferos marinhos de cativeiro (*Tursiops truncatus* e *Odobenus rosmarus*) do Canadá. Toxoplasmose clínica também foi relatada em leão marinho *Zalophus californianus* (MIGAKI et al., 1977), em foca do gênero *Phoca vitulina richardsi* (VAN PELT e DIETERICH, 1973), golfinhos dos gêneros *Stenella*

longirostris (MIGAKI; SAWA; DUBEY, 1990), *Stenella coeruleoalba* (DOMINGO et al., 1992; DI GUARDO et al., 2010) e em *Tursiops truncatus* (INSKEEP et al., 1990).

A forma de transmissão da toxoplasmose para os mamíferos aquáticos não está totalmente esclarecida, uma vez que os mesmos se alimentam de animais pecilotérmicos ou são restritamente herbívoros (DUBEY et al., 2007). O mesmo pode ser dito em relação aos que ingerem pequena ou até mesmo nenhuma quantidade de água e seu requerimento nutricional é derivado de peixes, invertebrados e lulas (CABEZON et al., 2004) e a maioria deles se alimentam de animais aquáticos de sangue frio nos quais o parasito não se multiplica.

Cole et al. (2000) sugeriram que os animais marinhos adquirem a infecção por *T. gondii* ingerindo invertebrados, que atuariam como agentes foréticos para os oocistos de *T. gondii*. Segundo esses autores, fezes de gatos contendo oocistos de *T. gondii* poderiam entrar no ambiente marinho por meio da água das chuvas. Já foi observada uma correlação positiva entre a presença de enchentes na costa marinha americana e a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em lontras. Nesse estudo o consumo de oocistos pelas lontras pudesse ter ocorrido por contaminação direta da água ou pelo consumo de invertebrados (MILLER et al., 2001).

Estudos experimentais, realizados nos Estados Unidos e no Brasil, mostraram que as ostras (*Crassostrea virginica*, *C. rhizophorae* e *Mytella guyanensis*) são capazes de remover oocistos de *T. gondii* da água do mar e mostraram-se infectantes para camundongos (LINDSAY et al., 2001; LINDSAY et al., 2004; ESMERINE et al., 2010).

Lindsay et al. (2003) observaram que os oocistos de *T. gondii* podem esporular na água do mar e infectar hospedeiros intermediários, permanecendo viáveis por até seis meses neste ambiente. A esporulação dos oocistos foi testada em ácido sulfúrico 2%, em 15 e em 32 ppm de água do mar. Os camundongos inoculados oralmente com oocistos que esporularam em ácido sulfúrico e em 15 e 32 ppm de água marinha desenvolveram toxoplasmose aguda e morreram dentro de seis a oito dias pós-inoculação, confirmando que oocistos esporulam na água do mar e mantêm a infectividade para os hospedeiros intermediários. Essa infectividade foi avaliada por até seis meses. Posteriormente, Lindsay e Dubey (2009) demonstraram que a infectividade dos oocistos pode ser mantida por até 24 meses nas condições de salinidade da água do mar.

Massie et al. (2010) relataram que peixes filtradores também podem atuar como vetores mecânicos de *T. gondii* e serem uma possível fonte de infecção para mamíferos aquáticos que se alimentam de peixes.

Isolamento de *T. gondii* em tecidos de mamíferos aquáticos foram obtidos a partir de lontras do mar, golfinhos, focas e leão marinho (CONRAD et al., 2005), entretanto a maioria

dos isolamentos foram efetuadas em lontras do mar (COLE et al., 2000; LINDSAY et al., 2001). Sundar et al. (2008) obtiveram 15 isolados de *T. gondii* de origem de lontras por meio de bioensaio em camundongos e em gatos e nenhum desses isolados foi virulento para camundongos. Dubey et al. (2008) com a mesma metodologia isolaram *T. gondii* de golfinhos da costa leste dos Estados Unidos, da Costa Rica (DUBEY et al., 2007) e do Canadá (DUBEY et al., 2009).

Estudos recentes sobre a mortalidade associada à toxoplasmose em lontras marinhas contribuíram com novas informações sobre a relação parasito-hospedeiro associando aspectos clínicos com o genótipo de *T. gondii* e resultaram na descrição de um novo genótipo denominado X (CONRAD et al., 2005). Dos 50 isolados de *T. gondii* de lontras genotipados com quatro genes polimórficos (B1, SAG1, SAG3 e GRA6), 70% foram identificados como tipo X, 28 % eram do tipo II e nenhum isolado tipo I ou III foi encontrado (CONRAD et al., 2005). Sundar et al. (2008), utilizando dez marcadores genéticos em 20 isolados previamente obtidos por Cole et al. (2000) e 17 novos isolados, utilizaram a PCR-RFLP em nove marcadores genéticos e o sequenciamento do DNA no marcador GRA6 sendo definidos seis genótipos; quatro relacionadas ao tipo II, um ao tipo X e um novo genótipo denominado tipo A. Embora o genótipo tipo X tenha sido associado a mortalidade de lontras do mar, de golfinhos do Pacífico e de um leão marinho da Califórnia (CONRAD et al., 2005), este isolado não foi encontrado causando mortalidade no estudo de Sundar et al. (2008) que também não observaram os isolados tipo I ou tipo III nos mamíferos marinhos.

Os registros sobre a toxoplasmose em mamíferos marinhos e de água doce brasileiros ainda são muito incipientes. Silva et al. (2000) examinaram 12 peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus manatus*) e encontraram um animal soropositivo (8,3%), sendo este o primeiro relato de ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em animais dessa espécie no Brasil.

A leptospirose é uma doença infecto-contagiosa que coloca em risco a reprodução dos animais, comprometendo a fertilidade e conseqüentemente a produção de leite e carne em rebanhos infectados. Além dos problemas relacionados à saúde animal, destacam-se também aqueles relacionados à saúde pública por ser esta uma grave zoonose. Os animais portadores assintomáticos não apresentam a doença clínica, mas são fontes de infecção em potencial para outras espécies, inclusive para o homem (CUNHA et al., 1999).

A doença está distribuída em todo o Brasil, ocorrendo sob forma endêmica, com surtos epidêmicos em algumas situações. Casos humanos têm ocorrido no Brasil, principalmente, em cidades em que as condições topográficas, de saneamento básico e precipitação pluviométrica são favoráveis ao agente (CUNHA et al., 1999).

A leptospirose é causada por microorganismos pertencentes à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae, que está dividida em três gêneros: *Leptospira*, *Leptonema*, *Turneria*. As leptospirosas são espiroquetas helicoidais, móveis e aeróbias e possuem formas de gancho em uma ou nas duas extremidades, tem crescimento lento e são visíveis em microscopia de campo escuro em preparações úmidas (FAINE, 1994). Possuem membrana plasmática e parede celular envolta por uma membrana externa que contém poros que possibilitam a troca de soluto entre o espaço periplasmático e o ambiente. Tais características tornam as leptospirosas bastante sensíveis às influências do ambiente que podem causar danos às suas estruturas. As leptospirosas preferem ambientes quentes e úmidos, neutros ou levemente alcalinos e podem sobreviver por meses em água fresca e solos úmidos (PLANK e DEAN, 2000).

O perfil epidemiológico da leptospirose está estreitamente ligado à paisagem, é uma enfermidade com uma história natural de uma doença endêmica, restrita a focos naturais bem definidos, com episódios epidêmicos em circunstâncias que envolvam alterações desordenadas do sistema ecológico. Considerando-se as relações ecológicas como um sistema dinâmico e organizado onde seus elementos integram de forma harmônica entre si, as leptospirosas devem ter se mantido em equilíbrio durante milênios na natureza e deve haver ainda regiões da Terra onde as leptospirosas se mantenham em uma cadeia nativa (CORTES, 1993)

Com o avanço do homem a novos ecossistemas, as paisagens naturais foram sofrendo profundas transformações, dando origem a novos arranjos e os agentes da leptospirose foram sendo disseminados a novas áreas e novos hospedeiros até atingirem o homem (CORTES, 1993).

As maiores prevalências de leptospirose ocorrem nos trópicos, em países em desenvolvimento. As condições ambientais ideais associados ao acelerado crescimento da população urbana, com as más condições sanitárias de grande parte da população e com a concentração de animais domésticos e sinantrópicos, como os roedores, aumentam o risco de exposição humana à doença (PLANK e DEAN, 2000).

A leptospirose é transmitida de animal para animal e de animal para o homem, a transmissão de homem para homem é rara e não tem importância epidemiológica (BRASIL, 1995). A transmissão pode ocorrer de forma direta por contato entre o infectado e um suscetível via urina infectada, descargas uterinas pós-aborto, placenta infectada, contacto sexual ou infecção do útero. A forma indireta ocorre devido à exposição ao ambiente contaminado ou devido a sistemas de manejo que permitam o contato entre animais

suscetíveis e os reservatórios. A forma indireta ocorre com maior frequência nas infecções acidentais (ELLIS, 1994; RADOSTITS et al., 2000).

As principais vias de penetração das leptospiros nos hospedeiros são a pele escoriada ou pele íntegra que tenha ficado muito tempo em imersão, e através das mucosas orofaríngea, nasal, ocular e genital (BRASIL, 1995). As leptospiros já foram encontradas no leite de animais infectados, mas nenhum caso de transmissão foi comprovado. O sêmen já teve leptospiros isoladas, tanto experimentalmente como naturalmente; o que faz supor que possa haver transmissão através da reprodução (ELLIS, 1994).

Após o contato e a entrada das leptospiros no hospedeiro o agente multiplica-se ativamente no interstício caracterizando a fase de bacteremia que é denominada de leptospiremia e pode durar de um a sete dias. Depois que o número de leptospiros no sangue e nos tecidos atinge um nível crítico, devido à ação das toxinas da bactéria, aparecem os sintomas. A lesão primária e a lesão do endotélio de pequenos vasos, que causam derramamento de sangue para os tecidos, formação de trombos levando a isquemia em órgãos, resultando em necrose tubular renal, dano hepatocelular, meningite, miosite e placentite. As hemorragias e icterícia ocorrem em casos severos. Durante este período as leptospiros podem ser isoladas da maioria dos órgãos e do fluido cerebrospinal. A fase de bacteremia primária termina com o aparecimento dos anticorpos circulantes, detectáveis geralmente dez dias após a infecção variando consideravelmente o tempo que eles persistem dependendo da espécie animal, do sorovar infectante e da via de infecção. A resposta inicial é de IgM com o pico ocorrendo entre dois a três semanas após a infecção. A resposta de IgG é muito mais lenta, aparecendo entre 12 a 30 semanas após a infecção. Após o período da leptospiremia as leptospiros se alojam principalmente nos túbulos contornados dos rins e no trato genital de animais maduros, aonde os anticorpos não chegam em grande quantidade ou não conseguem acessar. As leptospiros colonizam então os túbulos contornados dos rins podendo haver excreção pela urina. Esta fase é denominada leptospirúria e a eliminação passa a ser intermitente podendo persistir por períodos de longa duração variáveis com a espécie animal e o sorovar envolvido (ELLIS, 1994; FAINE, 1994, 1999).

O isolamento e a detecção de anticorpos para diversos sorovares de *Leptospira* têm sido confirmadas em diferentes espécies de animais silvestres de vida livre e de cativeiro em todo o mundo. Algumas espécies de animais foram confirmadas como reservatórios ao passo que outras como hospedeiras acidentais. A doença clínica em animais selvagens é rara e esta enfermidade geralmente é considerada de pouca importância para a saúde de populações destes animais (BENDER e HALL, 1996).

Os testes sorológicos são amplamente utilizados para a determinação da prevalência de doenças em populações de animais domésticos e selvagens (BENDER e HALL, 1996). A dificuldade para a realização um estudo de leptospirose em animais selvagens é a determinação da presença da infecção ativa e da capacidade da população estudada servir como reservatório (FOURNIER; GORDON; DORN, 1986).

A presença de anticorpos para leptospirosas foi relatada pela primeira vez em mamíferos aquáticos por Vedros et al. (1971) em leão marinho (*Zalophus californianus*) nos Estados Unidos. Focas do gênero *Monachus shauinslandi* foram encontradas positivas no Havaí (AGUIRRE et al., 2007). Na Nova Zelândia focas do gênero *Arctocephalus forsteri* (MAKERETH et al., 2005; CAMERON et al., 2008) foram soropositivos a bactéria e na Califórnia outros mamíferos aquáticos dos gêneros *Enhydra lutris*, *Phoca vitulina* e *Zalophus californianus* (GAGE et al., 1993; GULLAND et al., 1996; WHITEHOUSE et al., 2003; STAMPER et al., 1998; NORMAN et al., 2008) foram diagnosticados para o agente também pela sorologia. Lontras de vida livre (*Enhydra lutris*), no Alasca, foram diagnosticadas positivas (HANNI et al., 2003) e no litoral da Califórnia morsas do gênero *Mirounga angustirostris* (COLEGROVE et al., 2005).

O Quadro 2 apresenta os valores de ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. encontrados em mamíferos aquáticos em estudos realizados em diferentes regiões do mundo.

Quadro 2 – Ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em mamíferos aquáticos detectadas pela técnica de SAM, com ponto de corte 1:100 segundo a região estudada.

País	Nº de Examinados	Positivos (%)	Referência
EUA (São Francisco)	10	9	Vedros et al., 1971
EUA (Alasca)	40	10	Hanni et al., 2003
EUA (Califórnia)	452	21	Norman et al., 2003
EUA (Califórnia)	6	4	Colegrove et al., 2005
EUA (Califórnia)	27	100	Gulland et al., 2004
EUA (Havaí)	3	13	Aguirre et al., 2007

*SAM= Soroaglutinação microscópica com antígenos vivos

A constante interferência do homem na natureza tem causado transformações e danos muitas vezes irreparáveis. A expansão de áreas ocupadas pela população humana acarreta em perda de habitat de espécies selvagens e as obriga a ocupar áreas cada vez menores, levando a

uma situação de desequilíbrio. Essa situação não só pode levar à diminuição populacional de várias espécies animais, podendo chegar à extinção, como também selecionar espécies que se adaptam melhor à presença do homem, espécies sinantrópicas que podem servir como uma interseção entre a vida selvagem e a população humana.

Muitas espécies de mamíferos aquáticos da fauna brasileira atualmente se encontram na lista da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna Silvestre Ameaçadas de Extinção (CITES). Com relação ao ambiente em cativeiro, apesar dos esforços dos profissionais na manutenção de um rigoroso manejo sanitário, o ambiente de zoológicos e criadouros continua sendo propício à disseminação de uma gama de doenças, muitas delas zoonóticas (SIEMERING, 1986; FOWLER, 1993; SILVA et al., 2001). Vale à pena salientar que estes animais em quase sua totalidade mascaram os sinais clínicos, mesmo estando infectados com agentes etiológicos, constituindo-se importantes fontes de infecção para os animais domésticos e homens ou vice-versa (ACHA e SZYFRES, 2001; FOWLER, 1993; CUBAS, 1996).

Em relação à fauna da Amazônia, são raros os trabalhos que relatam a infecção por agentes infecciosos e parasitários. Como muitos dos animais são exclusivos desta peculiar região e o contato com seres humanos ainda ocorre em larga escala na Amazônia, estudos com estas espécies são extremamente importantes para o entendimento da epidemiologia de doenças parasitárias e infecciosas, bem como no conhecimento da importância desses animais silvestres na transmissão dessas enfermidades aos animais domésticos e ao homem naquela região.

O peixe-boi da Amazônia é o menor dos sirênios, medindo cerca de três metros de comprimento total e pesando aproximadamente 450 Kg quando adulto. Possui uma coloração cinza escuro com manchas brancas ou róseas na região ventral, características da espécie (CALDWELL e CALDWELL, 1985; ROSAS, 1994), embora alguns indivíduos podem não apresentar essa mancha (Figura 2). Ao contrário das outras espécies da ordem Sirênia, não possuem unhas (JEFFERSON; LEATHERWOOD; WEBBER, 1993), seus dentes molares são menores e mais complexos (ROSAS, 1994). É totalmente herbívoro, não ruminante e alimenta-se de uma grande variedade de plantas aquáticas e semi-aquáticas (COLARES e COLARES, 2002). Preferencialmente permanecem em águas calmas, lagos e lagoas com temperaturas variando entre 22 °C e 30 °C, com vegetação aquática abundante (BEST, 1982).

Figura 2 - Peixes-bois da Amazônia, *Trichechus inunguis*

Essa espécie é endêmica da Bacia amazônica distribuindo-se desde os rios da Colômbia, Equador e Peru, inclusive na desembocadura com o Atlântico e imediações da ilha de Marajó (Brasil), sendo a costa do Amapá citada como área de simpatria com o peixe-boi marinho, *Trichechus manatus* (ROSAS, 1994).

No Brasil esta espécie tem sido encontrada nos principais tributários do Amazonas como, por exemplo, no baixo Tocantins, rios Tapajós, Nhamundá, Madeira, Negro, Xeruni, Branco e Purus. Não são encontrados nos altos rios Orinoco e Negro (BEST e DA SILVA, 1983) e, raramente aparecem nos altos rios Tocantins, Xingu e Tapajós (DOMNING, 1981). Também tem sido encontrado no rio Tacatú (Roraima) e nos rios Essequibo e Rupununni, na Guiana (CATANHEDE, 2002). Na Colômbia ocorrem nos rios Amazonas, Putumayo, Caquetá e baixo Apoporis. No Peru, já foi observado nos rios Napo, Tigre e Marañon, não havendo registro deste mamífero no rio Madre de Dios, na Bolívia. No Equador os peixes-boi ocorrem no rio Aguarico, Cuayabeno, Añangu, na confluência dos rios Grande e Cuyabeno e nos lagos Zancudococha, Inuya e Lorococha (TIMM et al., 1986). A figura 3 ilustra a distribuição de mamíferos aquáticos do gênero *Trichechus* nas Américas.

A pressão de caça combinada com a baixa taxa de reprodução desse animal vem reduzindo drasticamente as populações de peixe-boi. Atualmente o peixe-boi da Amazônia consta na Lista Oficial de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção como vulnerável (Brasil, 2003) e do Apêndice I da CITES (2000). Encontra-se classificado na categoria “vulnerável dependente de conservação” na classificação da IUCN – The World Conservation Union (HILTON, 2000).

No Brasil, as seguintes medidas legais estão relacionadas a proteção do peixe-boi da Amazônia: Decreto nº 78.802 de 23/11/1976 referente ao Acordo para a Conservação da Flora e da Fauna dos Territórios Amazônicos (Brasil e Peru); Decreto Legislativo nº 69 de 18/10/1978 – Tratado de Cooperação Amazônica (Bolívia, Brasil, Peru, Colômbia, Equador, Guiana, Suriname e Venezuela); Decreto nº 3.179 de 21/10/1982 – Regulamentação da Lei de Crimes Ambientais e Proibição da Caça, Pesca ou Captura de Pequenos Cetáceos, Pinípedos e Sirênios.

Figura 3 – Mapa da distribuição do peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) no Brasil e do peixe-boi marinho, *Trichechus manatus*, nas Américas.
Fonte: Souza-Lima (2002).

Silveira (1988) cita relatos de caça ao peixe-boi da Amazônia estão relacionando os abate para o consumo da carne pelas populações humanas nativas, e o indicam como produto de exploração comercial, estimando que cerca de 4.000 a 10.000 peixes-bois tenham sido mortos no Brasil com propósitos comerciais entre 1935 e 1960.

Reeves e Leatherwood (1996) ressaltam que a carne e a gordura do peixe-boi da Amazônia constituem um item alimentar comum das populações indígenas e dos ribeirinhos da região amazônica. Apesar da existência das medidas legais acima citadas, a caça comercial e de subsistência ainda persiste (LASSARINI et al., 1998; ROSAS, 1994).

Rosas (1994) consideram os peixes-bois da Amazônia animais relativamente solitários, apresentando pouca ou nenhuma interação com os outros animais da mesma espécie e da mesma área. A única estrutura social duradoura é entre mãe e filhote, podendo durar no mínimo dois anos (DASILVA et al., 2002). Segundo Best (1984) ocorre agregações durante o período reprodutivo e durante a estação de seca, quando os animais permanecem nas áreas mais profundas dos corpos de água. Outros estudos sobre comportamento desses animais foram conduzidos por Souza-Lima et al. (2002) avaliando os sinais acústicos como uma forma de comunicação.

Os peixes-bois da Amazônia exibem um pequeno dimorfismo sexual e a distância entre a fenda genital e o anus é a chave para se determinar o sexo. Nas fêmeas a fenda genital está próxima do anus e nos machos a fenda está próxima a cicatriz umbilical. Ambos os sexos possuem duas mamas localizadas na inserção ventral das nadadeiras peitorais (RODRIGUEZ, 2002).

A reprodução nos peixes-bois possui um ciclo reprodutivo sazonal, correlacionando a influência do ciclo hidrológico dos rios da bacia Amazônica com a taxa de nascimentos e a disponibilidade de alimentos (BOYD et al., 1999).

Em relação às enfermidades observadas em peixes-bois da Amazônia diversos agentes etiológicos tais como: abscessos ocasionados por bactérias (*Proteus vulgaris*, *Streptococcus* spp, *Clostridium perfringens*, *Edwardsiella* spp), micobacteriose (*Mycobacterium chelonae*), papilomatose cutânea (papilomavirus), osteomielite (*P. morganii*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*), micose cutânea (Hyphomycete) e cryptosporidose (*Cryptosporidium parvum*) (CUBAS et al., 2007; BORGES et al., 2007) já foram descritos. Embora alguns agentes sejam conhecidos nestes sirênios, não há relatos da ocorrência de *T. gondii* e de leptospiros nesta espécie.

A determinação da ocorrência e da distribuição de patógenos, nas populações selvagens de vida livre e cativas como os peixes-bois é tarefa urgente e prioritária. Isto se

deve, principalmente, ao fato de que a qualificação/quantificação do risco da ocorrência de uma determinada enfermidade, e conseqüentemente de seu impacto sobre a biodiversidade, é dependente e subordinado ao conhecimento das informações epidemiológicas dos agentes mórbidos e de suas relações com os hospedeiros potenciais (BALLOU et al., 2000).

2 OBJETIVO

Este estudo teve por objetivo:

Avaliar a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Leptospira* spp. em peixes-bois (*Trichechus inunguis*) da Amazônia Brasileira mantidos em cativeiro em dois centros de preservação do Estado do Amazonas, Brasil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais do estudo

Este estudo foi realizado em parceria com o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Laboratório de Pesquisas em Mamíferos Aquáticos e do Centro de Pesquisas e Preservação dos Mamíferos Aquático da Amazônia – CPPMA, ambos localizados no estado do Amazonas, nas cidades de Manaus e de Balbina, respectivamente. Estes dois Institutos estão a 200 km de distância entre si e são centros de pesquisas que trabalham com aspectos relativos à reprodução, nutrição, fisiologia, etologia, biologia, distribuição e ecologia de mamíferos aquáticos brasileiros.

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), em São Paulo, SP.

No INPA os peixes-bois adultos são mantidos em três tanques de 10 metros de diâmetro e 2,7 metros de profundidade e os jovens em tanques de fibra de vidro com 4,5 metros de comprimento por 2,7 metros de largura e 1,1 metros de profundidade (Figura 4). No CPPMA os peixes-bois adultos são mantidos em tanques de dez metros de diâmetro e com 3,2 metros de profundidade e os jovens em tanques de cimento de 4,5 metros de comprimento por 2,7 metros de largura e 1,1 metros de profundidade (Figura 5).

A alimentação dos peixes-bois, em ambos os Institutos, está baseada em uma dieta composta por uma grande diversidade de frutas, verduras e gramínea (*Melinis repens*), o alimento é fornecido *ad libitum*.

O capim, alimento fundamental na dieta dos animais, no INPA é colhido na zona urbana da cidade de Manaus e no CPPMA em um lago próximo ao Centro de conservação, um local distante do meio urbano, ao redor de 3 km do povoado mais próximo.

A água utilizada para encher os tanques no INPA é captada de um poço artesiano de 70 metros de profundidade e trocada a cada dois dias e no CPPMA procede de um lago próximo ao Centro e é trocada a cada 30 dias.

No INPA foi observada a presença de vários gatos próximos aos tanques dos animais, já no CPPMA, devido à presença de aves nativas que lá são tratadas para reintrodução na vida selvagem, gatos e outros predadores são controlados, não sendo permitidos neste ambiente.

Figura 4 – Vista lateral dos tanques do Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, que alojam os peixes-bois.

Figura 5 – Vista superior de um tanque do Centro de Preservação e Pesquisas de Mamíferos Aquáticos (CPPMA), Balbina, AM, onde são mantidos os peixes-bois.

3.2 Animais

Foi realizada triagem sorológica para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*Leptospira* spp. nos peixes-bois provenientes de vida livre (72) e nascidos em cativeiro (2), com média de idade no INPA de sete anos e seis meses, com idade mínima e máxima de um e

18 anos. No CPPMA a idade média era seis anos e nove meses, com mínima de um ano e máxima de 20 anos e sete meses. As idades dos animais foram fornecidas pelas fichas técnicas dos animais e representam o tempo do animal no Centro, desde sua introdução até o momento da amostragem (01/2010). Como praticamente todos os animais são procedentes de vida livre e chegaram nesses Centros bastante jovens, a idade da ficha técnica é considerada a idade real dos animais.

O Quadro 3 apresenta a distribuição das amostras por local, sexo e idade dos peixes-bois.

Quadro 3 - Número de peixes-bois amostrados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e no Centro de Pesquisa e Preservação de Mamíferos Aquáticos (CPPMA) segundo o sexo e a idade dos animais - Amazonas, 2010.

Variável	INPA	CPPMA	Total
<i>Sexo</i>			
Macho	20	16	36
Fêmea	19	19	38
<i>Idade (anos)</i>			
Jovem (<5)	13	12	25
Adulto (≥ 5)	26	23	49
Total	39	35	74

3.3 Colheita de sangue

A contenção do animal é uma etapa importante para a coleta de sangue, pois o peixe-boi é uma espécie que tem como principal defesa a sua extraordinária força. Movimentos laterais e dorsoventrais da nadadeira caudal e rolamento do corpo podem infringir ferimentos sérios nas pessoas à sua volta durante a contenção.

Após a drenagem de toda a água dos tanques os animais foram colocados numa superfície macia, uma espuma de densidade D-33 medindo 2,5m de comprimento, 1m de largura e 10 a 15cm de espessura. As características antiderrapantes da espuma e o peso do animal atuam como uma forma de contenção.

As amostras foram coletadas do plexo branquial na fase interna em função da facilidade da imobilização do membro. A agulha foi posicionada em ângulo de 90°, a punção foi feita entre o rádio e a ulna sem realizar garrote utilizando-se tubos estéreis a vácuo.

Os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos para obtenção do soro que foi conservado a -20 °C até a realização dos análises. As amostras foram transportadas por via aérea, com gelo seco, até os laboratórios do VPS-FMVZ-USP.

3.4 Exame sorológico para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*

Os soros dos mamíferos aquáticos foram examinados para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* através do Teste de Aglutinação Modificado (MAT) segundo Dubey e Desmonts (1987).

A diluição dos soros foi feita em microplacas (96 poços) usando solução de salina tamponada, pH 7,2 (NaCl 0,146M; NaH₂PO₄ 0,0026M; Na₂HPO₄ 0,008M), filtrada em membrana de 45 µm de porosidade. Em seguida, 80 µL de antígeno-estoque (taquizoítos inteiros fixados em formalina) foram diluídos em 2,5mL de solução salina tamponada, pH 8,95 (NaCl 0,12M, H₃BO₃; 0,05 M ; NaN₃ 0,03M; albumina sérica bovina para uma solução de uso de 0,4%), 35 µL de mercaptoetanol 0,2M e 50 µL de azul de Evans 0,2%. Essa mistura foi então homogeneizada e distribuída imediatamente em uma microplaca (96 poços) com fundo de “U”, resultado em 25 µL de reagentes por poço. Os soros diluídos eram transferidos para essa microplaca e misturados aos reagentes (V/V). A placa era selada com plástico adesivo para evitar evaporação e incubada por 12hs durante a noite em estufa a 37°C.

A formação de um botão de contorno definido na base do poço da placa era anotada como resultado negativo; um carpete completo ou um véu de contorno pouco definido era anotado como positivo (DESMONTS e REMINGTON, 1980).

Os animais com título igual ou superior a 25 foram considerados positivos (DUBEY; THULLIEZ; POWELL, 1995; DUBEY; THULLIEZ; WEIGEL et al., 1995; DUBEY, 1997). As amostras, foram analisados nas diluições seriadas de 1:25, 1:50 e 1:500. Em todas as reações foram utilizados controles positivo e negativo, previamente conhecidos e controle do antígeno. O antígeno foi fornecido gentilmente pelo Dr. J. P. Dubey do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em Beltsville, Maryland, sendo enviados por via aérea.

3.5 Exame sorológico para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp.

As amostras foram processadas no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do VPS-FMVZ-USP, São Paulo.

A técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos (FAINE et al., 1999), prova de referência pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o diagnóstico da leptospirose, foi empregada para mensuração dos níveis de aglutinas para todas as amostras de soros. Os soros foram colocados a temperatura ambiente para descongelamento. Uma alíquota de 100µL foi recolhida com auxílio de pipeta automática e adicionada a 4,9 mL de solução salina tamponada de Sorensen. Cada amostra foi testada com 24 sorovares da coleção de referência.

A soroaglutinação microscópica foi realizada com uma coleção de culturas vivas de *Leptospira* spp., totalizando 24 variantes sorológicas, apresentadas no Quadro 4. As culturas de leptospirosas foram mantidas em meio líquido de EMJH (DIFCO™, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, Miami, USA)) modificado (ALVES, 1996) suplementado com 15% de soro estéril de coelho enriquecido com 1% de piruvato de sódio, 1% de cloreto de cálcio, 1% de cloreto de magnésio e 3% de L-asparagina.

Para a triagem das amostras de soro foram inicialmente diluídas 1:50 em solução salina tamponada de Sorensen. Desta diluição, foram retirados 50µL que foram distribuídos em microplaca de poliestireno de fundo chato com 96 poços, logo após foi acrescentado 50µL de antígeno correspondente nos poços obedecendo à marcação das placas (soro testado x antígeno), obtendo-se uma diluição final de 1:100. Cada amostra sorológica foi testada frente à coleção de 24 estirpes de leptospirosas. As microplacas foram agitadas e incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C por 3 horas.

Os soros reagentes na triagem foram novamente testados para a determinação do título final de aglutinas anti-leptospirosas, efetuando-se diluições seriadas em escala geométrica de razão dois em solução salina tamponada de Sorensen e acrescidas de 50µL do antígeno que reagiu como positivo no teste de triagem. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C por 3 horas.

As leituras foram realizadas em microscópio óptico, com condensador de campo de campo escuro seco, com lente objetiva Epiplan 10 x 0,20 e de ocular 10 (100x), observando-se a formação de aglutinações. O título das reações positivas foi a recíproca da mais alta diluição do soro, na mistura soro-antígeno que apresentou 50% de leptospirosas aglutinadas por campo microscópico (FAINE et al., 1999).

3.6 Análise estatística

A associação das frequências de animais soropositivos e os locais das colheitas, a idade e o sexo, foram analisados pelo teste de qui-quadrado para duas proporções. Nos casos em que este não pode ser aplicado, o teste exato de Fisher quando indicados empregando-se o programa Epilnfo® versão 6.0 (Informática Médica e Telemedicina do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Quadro 4 - Coleção de antígenos vivos utilizados na Técnica de Soroaglutinação Microscópica aplicados a leptospirose segundo o sorogrupo e o sorovar - São Paulo, 2010.

Sorogrupo	Variante Sorológica (Sorovar)
Leptospiras patogênicas	
Australis	Australis Bratislava
Autumnalis	Autumnalis Butembo
Ballun	Castellonis
Batavia	Bataviae
Canicola	Canicola
Celledoni	Whitcombi
Cynopteri	Cynopteri
Grippotyphosa	Grippotyphosa
Hebdonadis	Hebdonadis
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni Icterohaemorrhagiae
Javanica	Javanica
Panamá	Panamá
Pomona	Pomona
Pyrogenes	Pyrogenes
Sejroe	Hardjo Wolffi
Shermani	Shermani
Tarassovi	Tarassovi
Djasiman	Sentot
Leptospiras saprófitas	
Andamana	Andamana
Seramanga	Patoc

4 RESULTADOS

4.1 Sorologia para detecção de anticorpos anti- *T.gondii*

Dos 74 peixes-bois examinados 29 (39,2%) foram positivos para os anticorpos anti-*T. gondii*. Todos os animais soropositivos apresentaram título de 25. A distribuição dos soropositivos, segundo o local de coleta das amostras, o sexo e a idade dos animais, encontra-se na Tabela 1 e Gráfico 1.

Tabela 1 - Associação entre a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em peixes-bois e as variáveis: local de colheita, idade e sexo.

Variável	Nº de peixes-bois			P
	Examinados	Positivos	%	
<i>Local de coleta</i>				0,000
INPA*	39	23	58,9	
CPPMA**	35	6	17,1	
<i>Idade (anos)</i>				0,688
Jovem (<5)	25	9	36,0	
Adulto (≥ 5)	49	20	40,8	
<i>Sexo</i>				0,168
Macho	36	17	47,2	
Fêmea	38	12	31,6	

* INPA= Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM

** CPPMA= Centro de Pesquisa e Preservação de Mamíferos Aquáticos, Balbina, AM

Gráfico 1 - Prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soro de peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*) segundo local de colheita, sexo e faixa etária.

A prevalência de animais soropositivos para *T.gondii* no INPA foi 3,44 vezes maior do que nos animais do CPPMA, com valores de 58,9% e 17,1% sendo esta diferença significativa ($p=0,000$).

Entre os animais jovens, 36,0% (9/25) foram positivos, sendo dois (16,6%) animais do CPPMA (2/12) e 7 (53,8%) do INPA (7/13). Os adultos apresentaram soropositividade de 40,8% (20/49) sendo 16 dos 26 (61,5%) adultos do INPA e quatro dos 23 (17,4%) do CPPMA. Não houve diferença significativa de soropositividade entre animais jovens e adultos ($p=0,688$) no total de animais examinados.

Em relação ao sexo, 47,2% (17/36) do total de machos e 31,6% (12/38) do total fêmeas foram positivos. Não houve diferença significativa de soropositividade entre fêmeas e machos ($p=0,168$). No CPPMA, não foram observadas diferenças significativas entre machos e fêmeas com dois dos 16 (12,5%) machos e quatro das 19 (21,0%) fêmeas positivas ($p=0,666$). Entretanto, no INPA a prevalência de machos soropositivos foi de 75% (15/20), 1,78 vezes maior que o valor observado nas fêmeas, de 42,1% (8/19) e esta diferença foi significativa ($p=0,037$).

O gráfico 2 e o gráfico 3 ilustram a prevalência de animais soropositivos no INPA e no CPPMA, respectivamente, para as variáveis analisadas.

Gráfico 2 - Prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soro de peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*) mantidos no INPA segundo sexo e faixa etária.

Gráfico 3 - Prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soro peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*) mantidos no CPPMA segundo sexo e faixa etária.

4.2 Sorologia para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp.

Dos 74 peixes-bois examinados 23 (31,1%) foram reagentes na SAM para pelo menos um dos 24 sorovares de *Leptospira* spp. utilizados, com títulos variando de 100 a 1600. Os principais sorovares reagentes foram: Patoc (21/23 positivos), Castellonis (2/23), Icterohaemorrhagiae (1/23) e Butembo (1/23). Houve coaglutinações entre sorovares Patoc, Castellonis e Icterohaemorrhagiae (títulos 100 e 200) em um animal (nº51). A Tabela 2 apresenta os resultados da prova de SAM para *Leptospira* spp.

A prevalência de animais soropositivos para *Leptospira* spp. no INPA foi 5,96 vezes maior do que nos animais do CPPMA, com ocorrência de 51,3% (20/39) e 8,6% (3/35) respectivamente, esta diferença foi significativa ($p=0,001$).

Entre os animais jovens, 16,0% (4/25) foram positivos, sendo um (8,3%) animal do CPPMA (1/12) e três (23,1%) do INPA (3/13). Os adultos apresentaram soropositividade de 38,8% (19/49) sendo 17 dos 26 (65,4%) adultos positivos do INPA e dois dos 23 (8,7%) do CPPMA. Houve diferença significativa entre as idades de animais soropositivos entre jovens e adultos ($p=0,045$).

Em relação ao sexo, 36,1% (13/36) do total de machos foi positivo, sendo um (6,2%) animal do CPPMA (1/16) e 11 (55,0%) do INPA (11/20). As fêmeas apresentaram soropositividade de 26,3% (10/38) sendo duas (10,5%) fêmeas positivas das 19 do CPPMA e nove (47,4%) das 19 do INPA. Não houve diferença significativa de soropositividade para *Leptospira* spp. entre o total de fêmeas e de machos ($p=0,363$). No CPPMA também não se observou diferença ($p=0,971$) entre as variáveis analisadas (sexo e idade), entretanto, no INPA a ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* spp. foi superior nos adultos em relação aos jovens ($p=0,013$).

A distribuição dos animais soropositivos para anticorpos anti-*Leptospira*, segundo o local de colheita de amostras, o sexo e a idade dos animais, é apresentada na Tabela 3 e Gráfico 4.

Tabela 2 – Amostras de soros de peixes-bois (*Trichechus inunguis*) positivas para sorovares de *Leptospira* por sexo, idade e local de coleta e título.

Nº peixes-boi	Sexo	Idade (meses)	Local de coleta	Sorovar	Título
12	F	182	CPPMA*	Butembo	100
30	M	144	CPPMA	Patoc	400
31	F	37	CPPMA	Patoc	1600
47	F	96	INPA**	Castellonis	100
51	F	216	INPA	Castellonis	100
				Icterohaemorrhagiae	100
				Patoc	200
54	M	79	INPA	Patoc	200
55	F	64	INPA	Patoc	400
56	F	115	INPA	Patoc	200
57	M	60	INPA	Patoc	400
59	M	63	INPA	Patoc	400
60	M	93	INPA	Patoc	800
61	M	43	INPA	Patoc	200
62	M	51	INPA	Patoc	200
63	F	82	INPA	Patoc	200
64	M	74	INPA	Patoc	400
65	M	111	INPA	Patoc	800
67	F	84	INPA	Patoc	400
68	M	94	INPA	Patoc	400
69	F	115	INPA	Patoc	400
71	F	12	INPA	Patoc	400
72	M	114	INPA	Patoc	800
73	F	72	INPA	Patoc	800
74	M	169	INPA	Patoc	1600

** INPA= Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.

* CPPMA= Centro de Pesquisa e Preservação de Mamíferos Aquáticos, Balbina, AM. M= macho; F= fêmea

Tabela 3 - Associação entre a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em peixes-bois (*Trichechus inunguis*) e as variáveis local de coleta, sexo e idade.

Variável	Nº de peixes-bois			P
	Examinados	Positivos	%	
Local de coleta				0,001
INPA*	39	20	51,3	
CPPMA **	35	3	8,6	
Idade (anos)				0,045
Jovem (<5)	25	4	16,0	
Adulto (≥ 5)	49	19	38,8	
Sexo				0,363
Macho	36	13	36,1	
Fêmea	38	10	26,3	

* INPA= Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.

** CPPMA= Centro de Pesquisa e Preservação de Mamíferos Aquáticos, Balbina, AM.

Gráfico 4 - Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em amostras de soro de peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*) segundo local de colheita, sexo e faixa etária.

Em 17 amostras de soros (animais nº 54, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 68, 69, 72, 73, 74) foi detectada a presença de anticorpos para ambos os patógenos, *T. gondii* e *Leptospira* spp. Todos esses animais eram provenientes do INPA e positivas para o sorovar Patoc, com títulos que variam de 200 a 1600 e para *T.gondii* com títulos de 25.

O Gráfico 5 e o Gráfico 6 ilustram a prevalência de animais soropositivos no INPA e CPPMA, respectivamente, para as variáveis analisadas.

Gráfico 5 - Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em amostras de soro de peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*) mantidos no INPA segundo sexo e faixa etária.

Gráfico 6 - Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em amostras de soro de peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*) mantidos no CPPMA segundo sexo e faixa etária.

5 DISCUSSÃO

5.1 *Toxoplasma gondii*

Apesar da indiscutível importância do emprego de métodos de sorodiagnóstico no levantamento soropidemiológico do *T.gondii* e das *Leptospira* spp. muitas vezes, a comparação dos resultados obtidos é difícil e deve ser feita com cautela, devido a diferenças de técnicas, pontos de corte, reagentes, equipamentos e amostragem. Assim, as comparações têm maior valor quando feitas num mesmo estudo como as comparações entre os dois Centros de pesquisa amostrados neste experimento.

A prevalência da toxoplasmose nas diferentes regiões do mundo varia de acordo com as condições climáticas, presença de felinos e com o tipo de criação e manejo de rebanhos, sendo encontrados valores de zero a 100% (DUBEY et al., 1987; DUBEY et al., 2010). Na região de Manaus, onde foram colhidas parte das amostras de sangue dos peixes-bois, elevada prevalência de anticorpos contra *T.gondii* foi relatada na população humana (70,59%) e em animais domésticos (90,63%) e silvestres (63,64%) nas últimas décadas (FERRARONI e MARZOCHI, 1983), indicando que o coccídio está presente no ecossistema da região infectando humanos e animais.

A infecção por *T. gondii* já foi relatada para diversas espécies de mamíferos aquáticos que incluem cetáceos, sirênios, pinípedes e mustelídeos (LAMBOURN et al. 2001; SILVA et al., 2001; RESENDES et al., 2002; DUBEY et al., 2003; CABEZÓN et al., 2004; MURATA et al., 2004; DUBEY et al., 2008; ALEKSEEV et al., 2009), entretanto o presente estudo é o primeiro relato da infecção por *T.gondii* em peixes-bois (*Trichechus inunguis*) nascidos em cativeiro e provenientes de vida livre da Amazônia Brasileira e da Bacia Amazônica. Os dados demonstram uma prevalência de 39,1% (29/74), indicando que esses sirênios foram expostos ao protozoário em algum estágio de suas vidas.

No presente trabalho todos os animais soropositivos apresentaram título anti-*T. gondii* de 25. Trabalhos anteriormente publicados, com diferentes espécies de mamíferos aquáticos, revelaram valores de ocorrência semelhantes (MIKAELIAN et al., 2000; DUBEY et al, 2003; CABEZON et al., 2004; MEASURES et al., 2004), com a mesma metodologia e ponto de corte empregados neste estudo. A maior frequência de mamíferos aquáticos, soropositivos pelo MAT (≥ 25), foi observada em lontras do mar encontradas mortas (77%) na Califórnia, em lontras aparentemente saudáveis (60%) em Washington, bem como em golfinhos do gênero *Tursiops truncatus* (96.8% e 100%) na Califórnia e na Flórida

respectivamente (DUBEY et al., 2003), entretanto nesses estudos os animais eram todos de vida livre.

O MAT, técnica amplamente utilizada nesses estudos, não exige conjugado espécie-específico, é simples de executar, o antígeno é estável durante meses a 4 °C e pode ser aplicável para todas as espécies de mamíferos e aves (DUBEY et al., 1995, 1997, 2002). O ponto de corte de 1:25 foi padronizado em estudos anteriores com mamíferos aquáticos nos quais houve associação entre a sorologia positiva ao MAT e o isolamento de *T. gondii* nos tecidos (DUBEY et al., 2003; MIKAELIAN et al., 2000).

No Brasil a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* foi relatada em duas espécies de mamíferos aquáticos por Silva et al. (2001), em botos-vermelhos, *Inia geoffrensis* (82,31%) de vida livre e em peixes-boi marinhos, *Trichechus manatus* (8,3%) de cativeiro, em ambos estudos a técnica empregada foi o MAT (≥ 25).

A via de transmissão do *T. gondii* para os mamíferos aquáticos ainda é desconhecida, uma vez que os mesmos ingerem pequeno ou até mesmo nenhum volume hídrico (CABEZON et al., 2004). Entretanto, alguns autores têm sugerido a água contaminada com oocistos como uma possível via de transmissão para pequenos cetáceos (DAN FORMAN et al., 2009). Os animais amostrados neste estudo eram mantidos em cativeiro, mas a maioria destes tem como procedência o ambiente natural, apesar de terem entrado nos Centros de conservação ainda bem jovens.

Segundo Fayer et al. (2004) é muito provável que a presença de *T. gondii* no ambiente aquático seja uma extensão do ciclo de vida terrestre do parasita. Os dejetos de felinos domésticos e silvestres contendo oocistos esporulados do parasito podem ser carregados por águas provenientes de esgoto, chuvas e resíduos agrícolas contaminando os rios, estuários, áreas costeiras e praias (BOWATER et al., 2003). Miller et al. (2002a) relacionaram águas poluídas como uma importante via de transmissão da toxoplasmose para a lontra-marinha (*Enhydra lutris nereis*) no sul da Califórnia. No meio marinho os oocistos de *T. gondii* são resistentes e capazes de manter a infectividade, por meses a anos, também na água salgada (LINDSAY et al., 2003, 2004; DUBEY et al., 2008), podendo infectar os animais que vivem nesses ecossistemas.

A alta ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* encontrada em *Trichechus inunguis* neste estudo pode ser atribuída tanto à contaminação dos alimentos, da água e das instalações com oocistos provenientes de gatos domésticos infectados, como anteriormente relatado em estudos com mamíferos marinhos mantidos em cativeiro (JARDINE e DUBEY, 2002) e/ou contaminação costeira, uma vez que estes animais viveram em rios, nos quais há uma

significante variação no nível da água, com amplitude anual média de 10,60 m (RAMALHO et al., 2009). Os peixes-bois situam-se nas margens dos principais canais ribeirinhos e em lagos profundos durante a estação de seca, podendo ter contato com águas poluídas por esgotos (ROSAS, 1994; COLARES e COLARES, 2002). Quando ocorre o aumento do nível da água dos rios, estes rios se distribuem em áreas anteriormente secas, entre as árvores e, oocistos oriundos de fezes de felídeos silvestres, podem ser mais facilmente carregados para as águas e serem ingeridos pelos mamíferos que lá vivem. Entretanto, como não foi possível a obtenção de amostras de peixes-bois de vida livre, estas suposições devem ser melhor investigadas.

Animais silvestres podem atuar como um importante reservatório de muitas doenças infecciosas, possuindo um significativo papel na ecologia e transmissão da doença. Entretanto, muitos agentes infecciosos podem ser originados de humanos, seus animais de estimação e de produção (FAYER et al., 2004). A fragmentação do habitat tem aumentado o contato entre os animais silvestres, os humanos e seus animais de companhia favorecendo assim a exposição a agentes patogênicos entre os mesmos (DASZAK et al., 2000). No INPA, o local que apresentou o maior número de animais soropositivos para *T. gondii*, existem gatos domésticos ao redor dos tanques os quais poderiam estar disseminando oocistos de *T. gondii* nesse ambiente. Um felino pode excretar milhões de oocistos nas suas fezes, os quais podem permanecer viáveis entre 15 °C a 35 °C de 32 dias a cerca de um ano (DUBEY et al., 1998). O clima no local é tropical úmido, com temperaturas nessa faixa durante o ano todo, o que pode favorecer a viabilidade dos oocistos no ambiente.

Outra observação que pode corresponder a um fator de risco para a infecção por este coccídio diz respeito à origem da gramínea oferecida na dieta dos animais, a qual é obtida de local densamente habitado por humanos e seus animais domésticos no INPA, enquanto no CPPMA esta tem origem de ambiente rural, no qual o contato com humanos e animais domésticos é menos provável.

É razoável supor que quanto maior a idade, maior a possibilidade de o animal expor-se ao risco de infecção por *T. gondii*, assim sendo, o tempo de permanência dos animais em cativeiro aumenta o risco para a aquisição da infecção. No presente estudo a idade dos animais representa o tempo que estes se encontram em cativeiro. Animais soropositivos ao *T. gondii* possuíram idade variando entre um a 15 anos e dois meses. O animal positivo mais jovem apresentava um ano de cativeiro, sendo impossível de se avaliar se a infecção foi adquirida antes ou após a introdução dos mesmos nos Centros. Os dois animais nascidos no cativeiro, amostrados no INPA, também eram positivos ao *T. gondii*, entretanto ambos são

adultos, com seis e nove anos de vida, e somente nestes animais pode-se afirmar que a infecção foi adquirida no cativeiro.

A grande ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* encontrados em peixes-bois sadios no presente estudo indica que a infecção pelo patógeno é freqüente, mas não necessariamente ocasiona doença nestes animais. No total de animais soropositivos analisados não houve diferença significativa em relação ao sexo e a idade, o que corrobora com outros estudos realizados com ocorrência de *T. gondii* em animais domésticos e silvestres (DUBEY e BEATTIE, 1988; DUBEY et al., 2003; PENA, 2004; RAGOZO, 2007). Entretanto no INPA foi observado um maior número de machos soropositivos ($p < 0,05$) fato difícil de ser discutido, em especial em animais de cativeiro que compartilham as mesmas instalações por toda a vida.

5.2 *Leptospira* spp.

A leptospirose é uma doença causada por uma bactéria espiroqueta *Leptospira* sendo uma doença de ampla distribuição geográfica que afeta uma grande variedade de animais domésticos e silvestres incluindo mamíferos aquáticos como pinípedes, cetáceos, sirênios e mustelídeos (STAMPER et al., 1998; FAINE et al., 1999; COLEGROVE et al., 2005). A leptospirose geralmente se apresenta nestes animais causando nefrites intersticiais com sinais clínicos de deficiência renal, incluindo desidratação, polidipsia, vômito e depressão (GULLAND et al., 1996). No presente estudo os animais se encontravam aparentemente saudáveis e sem sintomas da doença.

Os resultados obtidos demonstraram que peixes-bois provenientes de cativeiro, apresentaram anticorpos anti-*Leptospira* spp., detectados pelo SAM, teste recomendado pela OMS. Embora o SAM tenha sido desenvolvido para o uso em bovinos, diversos trabalhos demonstraram a sensibilidade e especificidade do teste em várias espécies de mamíferos aquáticos nos quais animais positivos para *Leptospira* pelo SAM apresentaram o quadro clínico da doença renal e nos quais o patógeno foi isolado nos rins (GAGE et al., 1993, GULLAND et al., 1996; COLAGROSS et al., 2002; COLEGROVE et al., 2005).

Do total de 74 peixes-bois examinados, foi observada uma prevalência de 31,1% (23/74), indicando que estes animais, em algum momento de suas vidas, infectaram-se pelo agente e produziram anticorpos específicos. Estudos realizados com diferentes espécies de mamíferos aquáticos relataram valores semelhantes (COLAGROSS et al., 2002; MACKERETH et al., 2005; NORMAN et al., 2008). Prevalência maior foi observada em leão

marinho, *Zalophus californianus*, 54% e 100% (GULLAND et al., 1994, WHITEHOUSE et al., 2003) e esta alta prevalência de *Leptospira*, foi relacionada a formação de grandes colônias, nos quais indivíduos infectados podem estar disseminando o agente, associado ao comportamento migratório dessas espécies animais, dispersando a doença de uma colônia para outra (COLAGROSS et al., 2002). O presente estudo representa o primeiro relato da ocorrência da infecção por *Leptospira* spp. em peixes-bois (*Trichechus inunguis*) da Amazônia mantidos em cativeiro.

Reação para quatro de 24 sorovares incluídos na coleção de antígenos empregados foram detectados nos soros dos animais. Três sorovares patogênicos, Butembo, Castellonis e Icterohaemorrhagiae e um saprófita, Patoc. Na Amazônia brasileira diversos sorovares de *Leptospira* foram relatados em animais silvestres e domésticos e no homem, entretanto o sorovar Icterohaemorrhagiae foi identificado como o principal sorovar ocasionando casos clínicos da doença em humanos nessa região (CONSTANTE et al., 1996). Apesar da baixa prevalência, reações positivas a este importante sorovar também foram identificadas nos peixes-bois analisados.

Dos resultados da SAM encontrados neste estudo o Patoc, saprófita, foi o mais freqüente, discordando de estudos realizados com pinípedes e cetáceos marinhos, nos quais foi descrito o sorovar Pomona como o mais freqüente e o principal responsável pelos casos clínicos nestes animais, seguido pelos sorovares, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Canicola (COLAGROOS et al., 2002; WHITENHOUSE et al., 2003; COLEGROVE et al., 2005; MACKERETH et al., 2005; NORMAN et al., 2008), entretanto nenhum desses estudos foi efetuada em animais da região estudada.

O encontro do sorovar Patoc, saprófita, apesar de não patogênico, pois não possui poder de colonização e penetração (JOHNSON e HARRIS, 1976; CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004), é de grande importância epidemiológica uma vez que, apesar de raro, já foi isolado de casos clínicos em outras espécies animais (CARROL e LECLAIR, 1969; COMBIESCU et al., 1958).

Da quantidade aproximada de 250 leptospiiras existentes, a coleção do VPS, uma das mais importantes do país, possui 20 sorogrupos com pelo menos um sorovar de cada grupo já descrito. Sorovares pertencentes ao mesmo sorogrupo podem apresentar reação cruzada na sorologia entre eles, considerando-se o mais provável sorovar, o responsável pela infecção, aquele com os mais altos títulos de anticorpos na reação. Entretanto o sorovar saprófita Patoc pode apresentar reação cruzada com sorovares patogênicos e, pela sua facilidade de

manutenção em laboratório, é muito utilizado como sorovar de triagem em estudos com leptospiros.

Quando uma amostra reage apenas com o sorovar Patoc pode ser indicativo de que o animal esteja infectado com um sorovar patogênico não incluído na coleção de antígenos utilizada e exigem como medida suplementar o diagnóstico por outros métodos que não o sorológico. Assim, o isolamento da bactéria seguido de sua caracterização molecular é necessário nesses casos uma vez que é possível o encontro de estirpes de leptospiros pertencentes a sorovares não descritos. Este é o caso do sorovar Patoc, que foi positivo em um grande número de reações nos animais amostrados, exigindo mais estudos para o esclarecimento da verdadeira estirpe de leptospira envolvida.

A epidemiologia da leptospirose para uma região específica pode ser sumarizada como alta frequência de infecção por sorovares adaptados a determinadas espécies domésticas e baixa frequência de infecção por sorovares adaptados a espécies silvestres, dando origem à infecção acidental (RADOSTITS et al., 2000). É muito provável que a presença dos sorovares de *Leptospira* encontrados seja resultado do contato com urina dos animais domésticos e silvestres infectados que circundam as instalações onde são mantidos os peixes-bois contaminando o ambiente com leptospiros. Devido à veiculação hídrica dessa bactéria maior importância deve ser dada a água dos tanques, bem como aos alimentos, que podem estar veiculando a infecção por leptospiros, além das características climáticas peculiares da região, favoráveis para a sobrevivência e manutenção da bactéria (FAINE et al., 1999).

A comparação das proporções de animais soropositivos entre os dois Centros estudados mostrou haver diferença significativa entre elas com maior prevalência no INPA, indicando a presença de fatores que estejam possibilitando a maior exposição dos animais a *Leptospira* nesse Instituto, como anteriormente discutido para a infecção pelo *T. gondii*. Esse risco pode estar relacionado ao manejo sanitário bem como a maior proximidade do INPA com a área urbana e provavelmente com maior presença de roedores sinantrópicos, que são os principais portadores e disseminadores da *Leptospira* nas áreas urbanas.

O sexo dos animais não apresentou diferença significativa, com machos e fêmeas igualmente reagentes, corroborando com os estudos realizados em leão marinho por Gulland et al. (1996) e Colagross et al. (2002). Entretanto estes autores relataram diferença significativa em relação à idade dos animais, com indivíduos adultos mais soropositivos que os jovens e atribuíram esta diferença ao comportamento sexual, migrando para outros grupos para copular e entrando em contato com indivíduos infectados. No presente estudo os adultos apresentaram maior soropositividade que os jovens indicando que com o aumento da idade a

oportunidade de contato com a bactéria e com a infecção nos tanques também aumenta, fato bastante comum em locais de preservação de animais, como criadouros, zoológicos e cativeiros. Entretanto, somente podemos afirmar que a infecção foi adquirida no cativeiro para os animais nº 60 e 72, nascidos no INPA.

6 CONCLUSÕES

Considerando os dados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- Peixes-bois mantidos em cativeiro nos centros de pesquisa e conservação, INPA e CPPMA, são soropositivos a anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Leptospira* spp.
- Animais do CPPMA apresentaram menor soroprevalência de anticorpos para os dois patógenos em relação ao INPA.
- Em relação ao total de animais examinados a idade e o sexo não apresentaram associação com a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii*.
- Em relação ao total de peixes-bois examinados, a idade apresentou associação com a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* com valores superiores nos adultos.

REFERÊNCIAS*¹

ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; DE LA CUEVA, H.; GULLAND, M. D.; AURIOLES-GAMBOA, D.; ARELLANO-CARBAJAL, F.; SUAREZ-GUEMES, F. Evidence of leptospira interrogans infection in california sea lion pups from the gulf of California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 1, p. 145–151, 2003.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2nd ed. Washintong: OPAS, 2001. 989 p.

AGUIRRE, A. A.; KEEFE, T. J.; REIF, J. S.; KASHINSKY, L.; YOCHER, P. K.; SALIKI, JEREMIAH T.; STOTT, J. L.; DUBEY, J. P.; ANTONELIS, R. B. G. Infectious disease monitoring of the endangered hawaiian monk seal. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 2, p. 229–241, 2007.

ALEKSEEV, A. Y.; USTINOVA, E. N.; TUMANOV, Y. V. Detection of specific antibodies to Morbilliviruses, *Toxoplasma* and *Brucella* species in eared seals in north-west of Pacific Ocean. **Mikrobiology**, v. 32, p. 63–65, 2009.

AMENDOEIRA, M. R. R.; DA COSTA, T.; SPALDING, S. M. *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. **Revista Souza Marques**, v. 1, n. 1, p. 15-35, 1999.

AJZENBERG, D.; COGNE, N.; PARIS, L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **Journal Infect Diseases**, v. 186, p. 684–689, 2002.

AJZERBERG, D.; BANULS, A. L.; SU, C.; DUMETRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal Parasitology**, v. 34, p. 1185–1196, 2004.

ASBURN, D. History and general epidemiology. In: HO-YEN, D. O.; JOSS, A. W. L. (Ed.). **Human toxoplasmosis**. Oxford: Oxford University Press, 1992. p. 1-25.

ARKUSH, K. D.; MILLER, C. M. LEUTENEGGER. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **International Journal Parasitology**, v. 33, p. 1087–1097, 2003.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BALLOU, J. D.; LOWENSTINE, L. J.; CATÃO-DIAS, J. L.; ZICCARDI, M.; COOK, R.; CURRO, M.; DEIN, J.; WOODFORD, M.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; WILD, D. Report on modeling information. In: PROCEEDINGS DISEASE RISK WORKSHOP, 2000, Omaha, Nebraska, USA. **Resumos...** Omaha, Nebraska, USA: International Union for Conservation of Nature/Conservation Breeding Specialist Group, 2000. p. 81-88.

BANDOLI, J. G.; DE OLIVEIRA, C. A. B. Toxoplasmose em *Sotalia guianensis*, Cetácea-Delphinidae. **Folha Médica**, v. 75, p. 459-468, 1977.

BARUZZI R. G. Contribution to the study of the toxoplasmosis epidemiology. Serologic survey among the Indians of the Upper Xingu River, Central Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 12, p. 93-104, 1970.

BENGIS, R. G.; KOCK, R. A.; FISHER, J. Infections animal diseases: the wildlife/livestock interface. **Revue Scientifique et Technique de office International des Epizooties**, v. 21, n. 1, p. 53-65, 2002.

BENDER, L. C.; HALL, P. B. *Leptospira interrogans* exposure in free ranging elk in Washintong, **Journal of Wildlife Diseases**, v. 32, n. 1, p. 121-124, 1996.

BEST, R. C. Foods and feeding habits of wild and captive Sirenia. **Mammal Review**, v. 11, n. 1, p. 3-29. 1982.

BEST, R. C.; DA SILVA, V. M. F. Artificial feeding for unweaned Amazonian manatees. **International Zoological Yearbook**, v. 22, p. 263-267, 1983.

BEST, R. C. The aquatic mammals and reptiles of the Amazon. In: SIOLI, H. (Ed.). **The Amazon. Limnology and landscape ecology of a might tropical river and its basin**. London: Blackwell's, 1984. p. 371-411.

BOOTHROYD, E. C.; HEHL, A.; KNOLL, L. J.; MANGER, I. D. The surface of *Toxoplasma*: more and less. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 28, p. 3-9, 1998.

BOOTHROYD, E. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 438-442, 2002.

BORGES, J. C. G.; LIMA, E. C.; ALVES, L. C.; VERGARA-PARENTE, J. E.; FAUSTINO, M. A. G.; LIMA, A. M. A.; LIMA, R. P. *Cryptosporidium* spp. em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) cativo no Centro Mamíferos Aquáticos, Ilha de Itamaracá, no estado de Pernambuco. **Biotemas**, v. 20, n. 3, p. 67-74, 2007.

BOYD, I. L.; LOCKYER, C.; MARSH, H. D. Reproduction in marine mammals. In: REYNOLDS, J. E., III and R. R. Reeves (Ed.). **Biology of marine mammals**. Washington: Smithsonian Inst. Press, 1999. Cap. 6. p. 218-286.

BOWATER, R. O.; NORTON, J. S.; JOHNSON, B.; HILL, P.; DONOGHUE, O. H. Toxoplasmosis in Indo-Pacific humpbacked dolphins (*Sousa chinensis*), from Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, p. 627-632, 2003.

BUERGELT, C. D.; BONDE, R. K. Toxoplasmic meningoencephalitis in a West Indian Manatee. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 183, p. 1294-1296, 1983.

BLENDER, C. D. Aspectos epidemiológicos de la leptospirosis In: ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986. (Publicación Científica, n. 503).

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais peçonhentos. **Manual de leptospirose**. 2. ed. Brasília: Ed. Brasília, 1995. 98 p.

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

CALDWELL, D.; MELBA, K.; CALDWELL, C. Manatees-*Trichechus manatus*, *Trichechus senegalensis*, and *Trichechus inunguis*. In: RIDGWAY, S. H.; HARRISON, S. R. Handbook of Marine Mammals: the Sirenians and Baleen Whales. New York: Academic Press, 1985. v. 3.

CAMERON, C. E.; ZUERNER, R. L.; RAVERTY, S. K. M.; COLEGROVE, S. A. NORMAN, D. M.; LAMBOURN, S. J.; JEFFRIES, J.; GULLAND, F. M. D. Use of polymerase chain reaction to detect *Leptospira* infection amongst pinniped populations during an outbreak in 2004 along the west coast of North America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 1728-1733, 2008.

CANTANHEDE, A. M.; DA SILVA, V. M. F.; FARIAS, I. P.; ASHRBEK, T.; LAZZARINI, S. M.; ALVES-GOMES, J. Phylogeography and population genetics of the endangered Amazonian manatee, *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia, Sirenia). **Molecular Ecology**, v. 14, p. 401-413, 2002.

CARROL, R. E.; LE-CLAIR, R. A. Isolation of leptospiral serotype patoc from cattle in southern California. **American Journal Veterinary Research**, v. 30, p. 2231-2232, 1969.

CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA (CITES). **Lists of species extinction**. 2000. Disponível: < www.cites.org >. Acesso em: 25 set. 2010.

COELHO, R. A. I.; KOBAYASHI, M.; CARVALHO, L. B. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 4, p. 229-31, 2003.

COMBIESCU, D.; STURDZA, N.; SEFER, M.; RADU, I. Recherces sur lês leptospiroses. **Archiv. Roum. Pathology. Exp.**, v. 17, p. 245-250, 1958.

CONRAD, P. A.; MILLER, M. A.; KREUDER, C.; JAMES, E. R.; MAZET, J.; DABRITZ, H.; JESSUP, D. A.; GULLAND, F.; GRIGG, M. E. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters assentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. **International Journal Parasitology**, v.35, p. 1155–1168, 2005.

COLARES, E. P.; COLARES, I. G.; BIANCHINI, A.; SANTOS, E. A. Seasonal variations in blood parameters of the Amazonian manatee, *Trichechus inunguis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 2, p. 165-171, 2002.

COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; HOWE, D. K.; RODERICK, C. L.; DUBEY, J. P.; THOMAS, N. J.; BAETEN, L. A. Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern otters (*Enhydra lutris nereis*). **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 3, p. 526-530, 2000.

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

COLEGROVE, K. M.; LOWENSTINE, L. J.; GULLAND, F. M. D. Leptospirosis in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) stranded along the California coast. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, p. 426–430, 2005.

CORTES, J. A. Aspectos epidemiológicos e ecológicos da leptospirose. In: ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE, 3., 1993, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1993. p. 62-65.

CUBAS, Z. S. Special challenges of maintaining wild animals in captivity in South America. **Office International des Epizooties Scientific and Technical Review**, v. 15, n. 1, p. 267-287, 2007.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes, **FEMS Microbiological Letters**, v. 28, p. 291-318, 2004.

CUNHA, E. L. P.; MOTA, R. A.; MEIRELES, L.; SILVA, C. C.; SILVA, A. V.; LANCONI, H. Pesquisa de aglutinas anti-leptospira em soros de caprinos no Estado de Pernambuco, Brasil, **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 38-40, 1999.

CRISTINA, N.; OURY, B.; AMBROISE-THOMAS, P.; SANTORO, F. Restriction-fragment-length polymorphisms amog *Toxoplasma gondii* strains. **Parasitology Research**, v. 77, n. 2, p. 266-268, 1991.

DAN FORMAN, W. N.; FRANCIS, J.; GUY. E. The sero-prevalence of *Toxoplasma gondii* in British marine mammals. **Memoria do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 296-298, 2009.
DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates: biological and epidemiological implications. **Journal of Parasitology**, v. 78, n. 5, p. 786-794, 1992.

DA SILVA, V. M. F. A new baby Amazonian manatee. **Sirenews**, n. 37, p. 23-26, 2002.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.; **HYATT, A. D.** Emerging infectious diseases of wildlife—Threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, p. 443–449, 2000.

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

DOMNING, D. P. Distribution and status of manatees *Trichechus* spp. near the mouth of the Amazon River, Brazil. **Biological Conservation**, v. 19, n. 2, p. 85-97, 1981.

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

DOWSON, A.; MEAGHER, M. The populations dynamics of brucellosis in the Yellowstone national park. **Ecology**, v.77, n. 4. p. 1026-1036, 1996.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **Journal of Experimental Medicine**, v. 132, p. 636–662, 1970.

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

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1988. 220 p.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 1–32, 1988.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 11, p. 1593-1598, 1994.

DUBEY, J. P.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C.; THULLIEZ, P. Toxoplasmosis in rats (*Rattus norvegicus*): congenital transmission to first and second generation offspring and isolation of *Toxoplasma gondii* from seronegative rats. **Parasitology**, v.115, p. 9–14, 1997.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis, sarcocystosis, isosporosis, and ciclosporosis. In: PALMER, S. R.; SOULSBY, E. J. L.; SIMPSON, D.J.H. (Ed.). **Zoonoses**. Oxford: Oxford University Press, 1998. p. 579-597.

DUBEY, J. P. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 215-219, 2001.

DUBEY, J. P.; GAMBLE, H. R.; HILL, D.; SREEKUMAR, C.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. **Journal Parasitology**, v. 88, p. 1234–1238, 2002.

DUBEY, J. P.; ZARNKE, R.; THOMAS, N. J.; WONG, S. K.; VAN BONN, W.; BRIGGS, M.; DAVIS, J. W.; EWING, R.; MENSE, M.; KWOK, O. C. H.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology**, v. 116, n. 4, p. 275-296, 2003.

DUBEY, J. P.; LIPSCOMB, T. P.; MENSE, M. Toxoplasmosis in an Elephant Seal (*Mirounga angustirostris*). **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 410-411, 2004.

DUBEY, J. R.; FAIR, R. A.; BOSSARTT, G. D.; HILL, D.; FAYERF, R.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C. H.; THULLIEZ, P. A. comparison of several serologic tests to detect antibodies to *toxoplasma gondii* in naturally exposed bottlenose dolphins (*tursiops truncatus*). **Journal Parasitology**, v. 9, n. 5, p. 1074-1081, 2005.

DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; ULRICH, V. Transplacental toxoplasmosis in naturally-infected white-tailed deer: isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from foetuses of different gestational ages. **International Journal Parasitology**, v. 38, p. 1057–1063, 2008.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 2010. 305 p.

ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Veterinary Clinics of North America. **Food and Animal Practice**, v. 10, n. 3, p. 463-478, 1994.

ESMERINI, P. O.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii* **Veterinary Parasitology**, v. 28, n. 170, p. 8-13, 2010.

FAINE, S. **Leptospira and Leptospirosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. 353 p.

FAINE, S. **Leptospira and Leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: MediSci, 1999. 272 p.

FAYER, R.; JITENDER, P.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 531-536, 2004.

FERRARONI, J. J.; MARZOCHI, M. C. A. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e grupamentos humanos da Amazônia. **Memoria do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, p. 98–109, 1983.

FIELD, H.; YOUNG, P.; YOB, J.M.; MILLS, J.; HALL, L.; MACKENZIE, J. The natural history of the hendra and nipah viruses. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 307-314, 2001.

FOURNIER, J.S.; GORDON, J.C.; DORN, C.R. Comparison of antibodies to leptospira in white tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and cattle in ohio. **Journal of wildlife Diseases**, v. 22, n. 3, p. 335-339, 1986.

FOWLER, M. E. (Ed.). **Zoo & wild animal medicine**. 3rd ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1993. 617 p.

GAGE, L. J.; GERBER, J. A.; SMITH, D. M.; MORGAN, L. E. Rehabilitation and treatment success rate of California sea lions (*Zalophus californianus*) and northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) stranded along the central and northern California coast, 1984–1990. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 24, p. 41–47, 1993.

GULLAND, F. M. D.; KOSKI, K.; LOWENSTINE, L. J.; COLAGROSS, A.; MORGAN, L.; SPRAKER, T. Leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the central California coast, 1981–1994. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 32, p. 572–580, 1996.

HANNI, K. D.; GULLAND, F. M.; ESTES, J.; STAEDLER M.; MURRAY, M. J.; MILLER, M.; JESSUP, D. A. Clinical pathology and assessment of pathogen exposure in southern and Alaskan sea otters. **Journal of Wildlife Disease**, v. 39, n. 4, p. 837-50, 2003.

HILTON, C. T. **IUCN red list of treathened species cambrige: IUCN**. London: Elsevier, 2000. 61 p.

HONNOLD, S. P.; BRAUN, R.; SCOTT, D. P.; SREEKUMAR, C.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in Hawaiian Monk Seal (*Monachus schauinslandi*). **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 695-697, 2005.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal Infection Diseases**, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

INNES, E. A. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comp. Immun. Microbiological of Infection Diseases*, v. 20, n. 2, p. 131-138, 1997.

INSKEEP, W.; GARDINER C. H.; HARRIS, R. K.; DUBEY, J. P.; GOLDSTON, R. T. Toxoplasmosis in Atlantic bottle-nosed dolphins (*Tursiops truncatus*). **Journal Wildlife Diseases**, v. 26, p. 377–382, 1990.

JACKSON, M. H.; HUTCHINSON, W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Advances in Parasitology**, v. 28, p. 55-105, 1989.

JARDINE, J. E.; DUBEY, J. P. Congenital Toxoplasmosis in a Indo-Pacific Bottlenose Dolphin (*Tursiops aduncus*). **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 197- 199, 2002.

JEFFERSON, T. A.; LEATHERWOOD, S.; WEBBER, M. A. Order Sirenia-manatees and Dugongs. In: JEFFERSON, T. A.; LEATHERWOOD, S.; WEBBER, M.A. (Ed.) **Marine Mammals of the world- FAO species identification guide**. Florida: , 1993. p. 204-213.

JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G. Differentiation pathogenic and saprophytic *Leptospira*, **Journal. Bacteriological**, v. 94, n. 1, p. 27-31, 1967.

KHAN, A.; SU, C. M.; GERMAN, G. A.; STORCH, D. B.; CLIFFORD, L. D.; SIBLEY, T. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. **Journal Clinical Microbiological**, v. 43, p. 5881–5887, 2005

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 942–949, 2006.

KAUFMAN, H. E.; MELTON, L.; REMINTONG, J. S.; JACOBS, L. Strains differences in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 45, n. 2, p. 189-190, 1959.

LAMBOURN, D. M.; JEFFRIES, S. J.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Harbor Seals (*Phoca vitulina*) in Southern Puget Sound, Washington. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 5, p. 1196-1197, 2001.

LASSARINI, S. M.; BARROSO, J. L.; BEGROW, A. A. A caça de subsistência e comercial do peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), no Estado do Amazonas 1994-1997. REUNIÃO DE TRABALHO DE ESPECIALISTAS DE MAMÍFEROS AQUÁTICOS DA AMÉRICA DO SUL, 8., 1998, Olinda. **Resumo...** Olinda: Universidade de Brasília, 1998. p. 105.

LEHMANN, T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfings, drift, and spistate selection in maintaining linkage disequilibria. **Infections. Genetics and Evolution**, v. 4, p. 107-114, 2004.

LEHMANN, T.; MARCET, P.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 103, n. 30, p. 11423-11428, 2006.

LINDSAY, D. S.; RITTER, D. M.; BRAKE, D. Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 909–911, 2001.

LINDSAY, D. S.; COLLINS, M. V.; MITCHELL, S. M.; COLE, R. A.; FLICK, G. J.; WETCH, C. N.; LINDQUIST, A.; DUBEY, J. P. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 687-688, 2003.

LINDSAY, D. S.; COLLINS, M. V.; MITCHELL, S. M. Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal Parasitology**, v. 90, p. 1054–1057, 2004.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Long-Term Survival of *Toxoplasma gondii* Sporulated Oocysts in Seawater. **Journal Parasitology**, v. 9, n. 4, p. 1019–1020, 2009.

LÜDER, C. G. K.; GROSS, U. Toxoplasmosis: from clinics to basic science. **Parasitology Today**, v. 14, n. 2, p. 43-45, 1998.

MASSIE, G. N.; WARE, M. W.; VILLEGAS, E. N.; BLACK, M. W. Uptake and transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by migratory, filter-feeding fish. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 296-303, 2010.

MACKERETH, G. F.; WEBB, K. M.; O'KEEFE, J. S.; DUIGNAN, P. J.; KITTELBERGER, R. Serological survey of pre-weaned New Zealand fur seals (*Arctocephalus forsteri*) for brucellosis and leptospirosis. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 53, n. 6, p. 428-32, 2005.

MEASURES, L. N.; DUBEY, J. P.; LABELLE, J.; MARTINEAU, D. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Canadian pinnipeds. **Journal Wildlife Diseases**, v. 40, p. 294-300, 2004.

MIGAKI, G.; ALLEN, J. F.; CASEY, H. W. Toxoplasmosis in a California sea lion (*Zalophus californianus*). **American Journal Veterinary Research**, v. 38, p. 135-136, 1977.

MIKAELIAN, I.; BOISCLAIR, J.; DUBEY, J. P.; KENNEDY, S.; MARTINEAU, D. Toxoplasmosis in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence estuary: two case reports and a serological survey. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, n. 1, p. 73-76, 2000.

MILLS, J. N.; CHILDS, J. E. Ecology studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 529-537, 1998.

MILLER, M. A.; SVERLOW, K.; CROSBIE, P. R. Isolation and characterization of two parasitic protozoa from a pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*) with meningoencephalomyelitis. **Journal Parasitology**, v. 87, p. 816-822, 2000.

MILLER, M. A.; GARDNER, I. A.; KREUDER, C.; PARADIES, D. M.; WORCESTER, K. R.; JESSUP, D. A.; DODD, E.; HARRIS, M. D.; AMES, J. A.; PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A. Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 997-1006, 2002.

MILLER, M.; CONRAD, P.; JAMES, E. R. Transplacental toxoplasmosis in a wild southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). **Veterinary Parasitology**, v. 153, p. 12-18, 2008.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE-BRASIL. **Instituição Normativa**, nº 3. 27 maio 2003.

MURATA, K.; MIZUTA, K.; IMAZU, K.; TERASAWA, F.; TAKI, M.; ENDOH, T. The Prevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Wild and Captive Cetaceans from Japan. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 896-898, 2004.

MORNER, T.; OBENDORF, D. L.; ARTOIS, M.; WOODFORD, M. H. Surveillance and monitoring of wildlife diseases. **Revue Scientifique et Technique de Office International des epizooties**, v. 21, n. 1, p. 67-76, 2002.

NORMAN, S. A.; DIGIACOMO, R. F.; GULLAND, F. M. D.; MESCHKE, J. S.; YLITALO, G. M. Risk factors for an outbreak of leptospirosis in California sea lions (*Zalophus*

californianus) in California in 2004. 2008. 51 p. Master Thesis (Epidemiology) - University of Washington, Seattle, Washington, 2008.

PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research Veterinary Science**, v. 81, p. 58–67, 2006.

PENA, H. F.J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 561-569, 2008.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of epidemiology microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1265-1276, 2000.

RAGOZO, A. M. A.; YAI, L. E. O.; OLIVEIRA, L. N. Isolation of *Toxoplasma gondii* from goats from Brazil. **Journal Parasitology**, v. 95, p. 323–326, 2007.

RAMALHO, E. E.; MACEDO, J.; VIEIRA, T. M.; VALSECCHI, J.; CALVIMONTES, J.; MARMONTEL, M.; QUEIROZ, H. L. ciclo hidrológico nos ambientes de várzea da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – médio Rio Solimões, período de 1990 a 2008. **Uakari**, v. 5, p. 61-87, 2009.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine**, 9th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. 1877 p.

RESENDES, A. R.; ALMERIA, S.; DUBEY, J. P. Disseminated toxoplasmosis in a Mediterranean pregnant Risso's dolphin (*Grampus griseus*) with transplacental fetal infection. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 1029–1032, 2002.

REEVES, R. R.; LEATHERWOOD, S. Amazonian manatees, *Trichechus inunguis*, in Peru: distribution, exploitation, and conservation status. **Interciencia**, v. 21, n. 6, p. 246-296, 1996.

RODRIGUES, F. R. **Características histológicas do aparelho reprodutor feminino de *Trichechus inunguis* (Natterer, 1883) (Mammalia: Sirenia).** 2002. 114 f. (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade do Amazonas, Manaus, 2002.

ROSAS, F. C. W. Biology, conservation and status of the Amazonian manatee *Trichechus inunguis*. **Mammal Review**, v. 24, n. 2, p. 49-59, 1994.

SAEIJ, J. P. J.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 476-481, 2005.

SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biochemical Parasitology Amsterdam**, v. 51, p. 291-300, 1992.

SILVA, J. C. R.; MARVULO, M. F. V.; PICAÑO, M. C.; LIMA, R. P.; VERGARA-PARENTE, J. E.; MARCONDES, M. C. C.; FERREIRA, P. M.; MORAIS, Z. M.; OGASSAWARA, S.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA-NETO, J. S. Pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, *Leptospira interrogans* e *Brucella abortus* em peixes-

bois-marinhos (*Trichechus manatus manatus*) mantidos em cativeiro. In: CONGRESSO E X ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 5., 2000. São Paulo. **Anais...** São Paulo: ABRAVAS, 2000. p. 27.

SILVEIRA, E. K. P. O manejo dos manatis do caribe, *Trichechus manatus manatus* (Linné, 1778), e da Amazônia *Trichechus inunguis* (Natter, 1883), em cativeiro e alguns aspectos da sua natural. **B. FBCN**, v. 23, p. 82-103, 1988.

SIEMERING, H. Zoonoses. In: FOWLER, M. E. (Ed.). **Zoo & wild animal medicine**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 63-68.

SOBRAL, C. A.; AMENDOEIRA M. R.; BALMUKUND, A. T.; PATEL, N.; CARLOS, H. KLEIN. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous brazilian populations. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 72, n. 1, p. 37-41, 2005.

SOARES, R. M. Caracterização molecular do *Toxoplasma gondii*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 17-19, 2004.

SOUSA-LIMA, R. S.; PAGLIA, A. P.; DA FONSECA, G. A. B. Signature information and individual recognition in the isolation calls of Amazonian manatees, *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia). **Animal Behaviour**, v. 63, n. 2, p. 301-310, 2002.

SUNDAR, N.; COLE, R. A.; THOMAS, N. J.; MAJUMDAR, D.; DUBEY, J. P.; SU, C. Genetic diversity among sea otter isolates of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, p. 125-132, 2008.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of toxoplasma gondii by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution an simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 7, p. 841-848, 2006.

SCHRAG, S. J.; WIERNER, P. Emerging infectious diseases: What are the relative roles of ecology and evolution. **Tree**, v. 10, n. 8, p. 319-323, 1995.

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

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. p. 407.

TENTER, A. M.; JOHNSON, A. M. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidian. **Advances in Parasitology**, v. 39, p. 69-139, 1997.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

TIMM, R. M.; ALBUJA, L. V.; BARBARA, L. C. Ecology, distribution, harvest, and ocnservation of the Amazonian manatee *Trichechus inunugis* in Ecuador. **Biotropica**, v. 18, n. 2, p.150-156, 1986.

VAN PELT, R. W.; DIETRICH, R. A. Staphylococcal infection and toxoplasmosis in a young harbor seal. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 9, p. 258-261, 1973.

VEDROS NA, SMITH AW, SCHONEWALD J, MIGAKI G, HUBBARD RC. Leptospirosis epizootic mong California sea lions. **Science**, v. 172, p. 1250-1251, 1971.

YOSHITAKA, O.; HAMMOND, T.; ITOH, K.; MURATA, K. Antibodies Against *Toxoplasma gondii* in the Pacific Bottlenose Dolphin (*Tursiops aduncus*) From the Solomon Islands. **Journal of Parasitology**, v. 91, n.4, p. 965-967, 2005.