

ARICIA DUARTE BENVENUTO

**Survey and molecular and pathological characterization of
selected emerging infectious agents in aquatic mammals of
Brazil**

São Paulo

2023

ARICIA DUARTE BENVENUTO

**Survey and molecular and pathological characterization of
selected emerging infectious agents in aquatic mammals of
Brazil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Patologia (VPT)

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

José Luiz Catão Dias, PhD

Co-orientador:

Carlos Sacristán Yagüe, PhD

São Paulo

2023

DUARTE-BENVENUTO, A. **Pesquisa e caracterização molecular e patológica de agentes infecciosos emergentes selecionados em mamíferos aquáticos do Brasil.** 2023. 160 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Os ecossistemas aquáticos são recursos fundamentais para a humanidade que estão sob crescente ameaça devido a interação antrópica. Os mamíferos aquáticos são considerados bioindicadores da saúde ambiental, servindo de sentinelas para avaliar esses impactos e a consequente emergência de agentes infecciosos. Dentre os agentes de etiologia viral e bacteriana conhecidos nesse grupo, alguns (e.g., morbilivírus, vírus da Influenza) já foram relacionados a alta morbidade e mortalidade, e portanto investigados com maior frequência, enquanto outros foram associados a relatos pontuais e pouco estudados, incluindo as bactérias do gênero *Mycoplasma*, e os vírus da família *Polyomaviridae* e do gênero *Orthoflavivirus*. Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar, identificar e caracterizar, por métodos moleculares e patológicos, as infecções causadas por esses agentes emergentes selecionados em amostras de mamíferos aquáticos de vida livre do Brasil. Todas as amostras utilizadas foram provenientes da rede de encalhes nacional entre 2002 e 2022, e de capturas científicas realizadas no bioma Amazônico em 2015, 2016, 2017 e 2020. A presença de micoplasmas foi avaliada em amostras de sangue de mamíferos aquáticos dos biomas Amazônico e marinho, totalizando 180 cetáceos, 49 sirênios e 18 pinípedes analisados. Já para as análises dos agentes virais foram utilizadas amostras de tecidos e soro apenas de cetáceos, incluindo 151 espécimes para *Orthoflavivirus* e 119 para *Polyomaviridae*, englobando 19 espécies. Micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) foram encontrados em 50 cetáceos e em três pinípedes, porém não foram detectados em nenhum dos sirênios analisados. Dentre os cetáceos, foi observada uma maior ocorrência nas espécies de golfinhos fluviais (32/50, 64%) comparado com as espécies marinhas (18/130, 13,8%), e nas primeiras foi observada estrutura genética de hemoplasma em relação ao local de coleta e a espécie. Foram observadas que ao menos duas espécies de hemoplasmas estão circulando nesse grupo, porém a maioria das sequências obtidas são muito similares, sugerindo um ancestral em comum. Adicionalmente, em duas espécimes de toninha (*Pontoporia*

blainvillei) avaliadas foi detectado a presença de um micoplasma não-hemotrópico em infecção sistêmica, com achados histopatológicos compatíveis com micoplasmose. Nos pinípedes, as sequências de hemoplasma obtidas foram muito similares às detectadas previamente, sugerindo baixa mutação dessas bactérias. Poliomavírus foram detectados em duas fêmeas juvenis (2/119; 1.7%) de boto-cinza (*Sotalia guianensis*) encalhadas no ano de 2018, que apresentavam co-infecção com morbillivirus. As lesões anatomopatológicas observadas e as sequências detectadas foram similares as observadas em uma infecção prévia detectada em golfinho-comum (*Delphinus delphis*) no Hemisfério Norte. As análises filogenéticas sugerem a ocorrência de uma potencial nova espécie de poliomavírus específica dos botos-cinza, e um potencial tropismo pelo sistema respiratório desses animais. Não foi detectado a presença de flavivírus em nenhuma das 586 amostras analisadas. Nesse estudo, realizamos a primeira detecção mundial de hemoplasmas em cetáceos, a segunda detecção em pinípedes, e a primeira detecção de mycoplasmas não-hemotrópicos e poliomavírus em cetáceos do Hemisfério Sul, ampliando o conhecimento a respeito dos agentes infecciosos virais e bacterianos circulando nesses animais.

Palavras-chave: Mamíferos marinhos. Doenças infecciosas emergentes. Mycoplasma. Flavivírus. Poliomavírus.

ABSTRACT

DUARTE-BENVENUTO, A. **Survey and molecular and pathological characterization of selected emerging infectious agents in aquatic mammals of Brazil.** 2023. 160 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Aquatic ecosystems are fundamental resources for humanity, but increasingly threatened by the consequences of such interaction. Aquatic mammals are considered bioindicators of environmental health, serving as sentinels to evaluate anthropogenic and environmental impacts, and the emergence of infectious agents. Some of the known viral and bacterial etiologic agents affecting marine mammals (e.g., morbillivirus, Influenza virus) have been associated with high morbidity and mortality, and thus have been investigated more thoroughly. On the other hand, other agents have only been studied in punctual reports and remain poorly understood, including bacteria of *Mycoplasma* genus, and viruses within the *Polyomaviridae* family and *Orthoflavivirus* genus. Therefore, the main goal of this study was to investigate, identify and characterize, through molecular and pathological methods, the agents and infections (when present) caused by these selected emerging infectious agents (i.e., hemotropic mycoplasma, *Polyomaviridae* and *Orthoflavivirus*) in samples from wild aquatic mammals of Brazil. All samples were provided by the Brazilian National Stranding Network between 2002 and 2022, and from scientific live captures in the Amazon biome in 2015, 2016, 2017 and 2020. Mycoplasma presence was evaluated in blood samples of aquatic mammals from the Amazon and marine biomes, with a total of 180 cetaceans, 49 sirenians and 18 pinnipeds tested. Regarding viral agents, we tested tissue and serum samples collected only from cetaceans, comprising 151 specimens for *Orthoflavivirus* and 119 for *Polyomaviridae*, across 19 different cetacean species. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) were found in 50 cetaceans and in three pinnipeds; however, they were not detected in any of the tested sirenians. Among cetaceans, we observed a higher occurrence rate in riverine dolphins (32/50, 64%) in comparison with marine species (18/130, 13.8%), with riverine dolphins presenting a genetic structure based on collection site and host species. Our findings indicate that although at

least two species of hemoplasma are circulating in cetaceans, the majority of the retrieved sequences were very similar, suggesting a common ancestry. Additionally, we detected a systemic non-hemotropic mycoplasma in two Franciscana dolphins (*Pontoporia blainvilei*) presenting histologic lesions compatible with mycoplasmosis. In pinnipeds, the retrieved hemoplasma sequences were very similar with those previously reported, indicating low bacterial mutation rate. Polyomavirus was detected in two juvenile female (2/119; 1.7%) Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) co-infected with morbillivirus that stranded in 2018. The anatomopathological findings and retrieved sequences were very similar to those of a previous infection detected in a short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) from the Northern Hemisphere. Phylogenetic analysis suggest that the detected polyomavirus is a potential novel species specific of Guiana dolphins with tropism for the respiratory system. We did not detect flavivirus in any of the 586 tested samples. Herein we report the first worldwide detection of hemoplasma in cetaceans and the second in pinnipeds, and the first detection of non-hemotropic mycoplasma and polyomavirus in cetaceans of the Southern Hemisphere, broadening the knowledge of viral and bacterial agents affecting and circulating in aquatic mammals.

Keywords: Marine mammal. Emerging infectious diseases. Mycoplasma. Flavivirus, Polyomavirus.