



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

VITOR LUZ CARVALHO

**FUNGOS ISOLADOS DE SIRÊNIOS E CETÁCEOS NO BRASIL: UMA
ABORDAGEM FENOTÍPICA, GENOTÍPICA, DIAGNÓSTICA E DE VIRULÊNCIA**

FORTALEZA

2015

VITOR LUZ CARVALHO

**FUNGOS ISOLADOS DE SIRÊNIOS E CETÁCEOS NO BRASIL: UMA
ABORDAGEM FENOTÍPICA, GENOTÍPICA, DIAGNÓSTICA E DE VIRULÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Micologia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

Co-orientadora: Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C329f Carvalho, Vitor Luz.
Fungos isolados de sirênios e cetáceos no Brasil: uma abordagem fenotípica, genotípica, diagnóstica e de virulência / Vitor Luz Carvalho. – 2015.
129 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.
Coorientação: Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.
1. mamíferos aquáticos. 2. leveduras. 3. microbiota. 4. resistência. 5. tipagem molecular. I. Título.
CDD 616.9
-

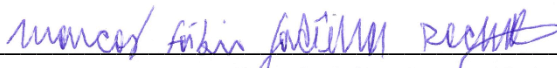
VITOR LUZ CARVALHO

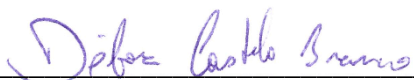
**FUNGOS ISOLADOS DE SIRÊNIOS E CETÁCEOS NO BRASIL: UMA
ABORDAGEM FENOTÍPICA, GENOTÍPICA, DIAGNÓSTICA E DE VIRULÊNCIA**

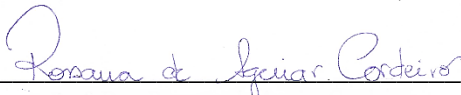
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Micologia.


Aprovada em: 30/07/2015

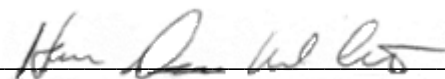
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha (Orientador)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)


Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Dra. Jociery Einhardt Vergara Parente
Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP)/ Fundação Mamíferos Aquáticos (FMA)


Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Universidade Regional do Cariri (URCA)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará (PPGMM/UFC) e seus professores pelo aprendizado e contribuição com a minha formação acadêmica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro recebido através das bolsas de estudo concedidas no Brasil e no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior

Ao Professor Marcos Fábio Rocha pela orientação segura, sua disponibilidade, cuidados constantes com a qualidade dos trabalhos produzidos por seus orientandos e confiança em mim depositada.

À Professora Débora Castelo Branco, que antes mesmo de se tornar minha co-orientadora, já era uma amiga muito querida e foi principal incentivadora para a realização dessa tese. Foi um grande presente termos nos reaproximado e podermos reafirmar nossa amizade, que sabemos melhor do que ninguém que é verdadeira!

Aos membros das bancas de qualificação e defesa pela disponibilidade e contribuições valiosas.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), representado pelo Prof. Júlio Sidrim, Profa. Raimunda Brilhante, Dra. Tereza Bandeira e Profa. Rossana Cordeiro, pelo suporte técnico para a realização desse trabalho. À Terezinha de Jesus pelo apoio e gentileza.

A Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (Aquasis), Centro de Preservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos (CPPMA), Centro Mamíferos Aquáticos (CMA/ICMBio), Associação Amigos do Peixe-boi (AMPA) e Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LMA/INPA), instituições parceiras que foram essenciais para a realização desse trabalho. Agradeço especialmente a Ana Carolina Meirelles, Cristine Negrão, Stella Lazzarini, Inês Serrano, Waleska Gravena, Rodrigo Amaral e Vera da Silva pela confiança em mim depositada!

Ao Instituto Pasteur pela abertura e suporte na realização de estudos moleculares dessa tese. Aos orientadores Christophe D'Enfert e Marie-Elizabeth Bougnoux e à Natacha Sertour pela receptividade, apoio, ensinamentos, paciência e simplicidade.

Aos colegas de doutorado e do CEMM, em especial à Gláucia Morgana (com direito a lágrimas), Giovanna Riello e Sabrina Tainah pelos bons momentos que tornaram os dias de laboratório mais leves, pela cumplicidade, apoio, generosidade e amizade!

A todos os amigos que fiz ao longo desses anos, que sempre me incentivaram e torceram por mim.

Aos meus pais Sheila Luz e Geraldo Carvalho pela família incrível que construíram, por todo o apoio, incentivo, ensinamentos e valores que repassaram com sabedoria e tranquilidade para mim e meus irmãos Lia, Fernando e Ivan Luz Carvalho.

E finalmente ao meu querido Cristian Paiva, por estar sempre ao meu lado, me dando todo o apoio e me cercando de cuidados, por querer ver meu crescimento e por ter me incentivado a me aventurar num doutorado sanduíche na França. Valeu muito a pena, serei sempre grato!

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi isolar fungos de sirênios e cetáceos no Brasil, visando investigar aspectos fenotípicos, genotípicos, diagnósticos e de virulência. Para tanto, foi coletado, com *swabs* estéreis, material da cavidade oral, narina/espírito, abertura genital e/ou reto de 104 animais, incluindo 50 peixes-bois-da-Amazônia (*Trichechus inunguis*), 33 peixes-bois-marinho (*T. manatus*), 13 botos-vermelhos (*Inia geoffrensis*), três cachalotes-anão (*Kogia sima*), dois golfinhos-cabeça-de-melão (*Peponocephala electra*), um cachalote-pigmeu (*K. breviceps*), um cachalote (*Physeter macrocephalus*) e uma baleia-jubarte (*Megaptera novaeangliae*). Dentre estes animais, um peixe-boi-da-Amazônia e oito peixes-boi-marinho apresentaram lesões suspeitas de micose cutânea, sendo realizados raspados de pele. Os *swabs* foram semeados em placas contendo ágar Sabouraud com cloranfenicol, mantidas a 37°C por cinco dias, enquanto as escamas de pele foram semeadas em tubos contendo ágar Sabouraud com cloranfenicol a 25°C por dez dias. As leveduras isoladas foram identificadas através de provas bioquímicas, micromorfologia, sistema automatizado Vitek, PCR, RFLP e/ou sequenciamento, enquanto os fungos filamentosos foram identificados pela macro e micromorfologia. As cepas de *Candida* spp. (n=114) obtidas foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo para avaliação do perfil de sensibilidade aos antifúngicos itraconazol, fluconazol e anfotericina B e aos testes de produção de fatores de virulência (fosfolipases, proteases e biofilme). Leveduras da espécie *C. albicans* foram submetidas à tipagem molecular por MLST. Foram diagnosticados dois casos de micoses superficiais cutâneas em sirênios, sendo uma levedurose mista por *C. tropicalis* e *Trichosporon asahii* e um caso de feohifomicose por *Bipolaris hawaiiensis*, bem como um surto de fusariose (*Fusarium* sp.). Foram isoladas 155 cepas, sendo 112 de *T. inunguis* (40 *Candida albicans*, 14 *C. parapsilosis sensu stricto*, 3 *C. metapsilosis*, 4 *C. orthopsilosis*, 9 *C. guilliermondii*, 3 *C. pelliculosa*, 2 *C. tropicalis*, 2 *C. glabrata*, 1 *C. famata*, 1 *C. krusei*, 1 *C. norvegensis*, 1 *C. cifferri*, 22 *Trichosporon* sp., 6 *T. asahii*, 2 *Rhodotorula* sp., 1 *Cryptococcus laurentii*), 29 de *T. manatus* (12 *C. albicans*, 4 *C. tropicalis*, 4 *C. famata*, 3 *C. guilliermondii*, 1 *C. krusei*, 1 *Rhodotorula* sp., 2 *R. mucilaginosa*, 1 *R. minuta*, 1 *Trichosporon* sp.) e 14 de cetáceos (6 *C. tropicalis*, 2 *C. parapsilosis*, 2 *C. famata*, 1 *Candida* sp., 3 *Cryptococcus* sp.). As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para anfotericina B variaram de 0,03 a 1 µg/mL, não sendo observadas cepas resistentes. As CIMs de itraconazol e fluconazol variaram de 0,03 a 16 µg/ml e de 0,125 a 64 µg/ml, respectivamente, sendo constatada resistência a pelo menos uma droga em 34,2% dos isolados, com destaque para *C. albicans* e *C. tropicalis*. Quanto aos fatores de virulência testados, 50% produziram fosfolipases, com elevada frequência em *C. albicans*; 50% produziram proteases, com maior prevalência em *C. albicans* e *C. tropicalis*; e 35% produziram biofilme em escalas variáveis, com maior prevalência em *C. tropicalis* e *C. orthopsilosis*. A tipagem molecular foi realizada com 45 cepas de *C. albicans*, obtendo-se genótipos pertencentes a seis clados dentre os 18 existentes para a espécie, variando de acordo com o hospedeiro e localização geográfica. Baseado no exposto, esse estudo representa uma contribuição sistemática e multidisciplinar acerca da micologia de mamíferos aquáticos.

Palavras-chave: mamíferos aquáticos, leveduras, microbiota, resistência, tipagem molecular

ABSTRACT

The aim of this work was to isolate fungi from sirenians and cetaceans and to investigate phenotypic, genotypic, diagnostics and virulence aspects. Sterile swabs were collected from the oral cavity, nostrils/blowhole, genital and/or rectal opening from 50 Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*) and 33 Antillean manatees (*T. manatus*), 13 Amazon river dolphins (*Inia geoffrensis*), three dwarf sperm whales (*Kogia sima*), two melon-headed whales (*Peponocephala electra*), one pigmy sperm whale (*Kogia breviceps*), one sperm whale (*Physeter macrocephalus*) and one humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). Among these animals, skin scrapings were performed in one Amazonian manatee and eight Antillean manatees with suspicious lesions of cutaneous mycosis. The swabs were plated into Sabouraud agar plates containing chloramphenicol, maintained at 37 ° C for five days, while the skin fragments were seeded in tubes containing Sabouraud agar with chloramphenicol at 25°C for ten days. The yeasts were isolated and identified by biochemical tests, micromorphology, Vitek system, PCR, RFLP and/or sequencing, as filamentous fungi were identified by macroscopic and microscopic morphology. Strains of *Candida* spp. (n=114) were submitted to a microdilution test for evaluation of sensitivity to the antifungal agents itraconazole, fluconazole and amphotericin B, as well as virulence factors testing (phospholipases, proteases and biofilm). Isolates of the species *C. albicans* were subjected to molecular typing by MLST. Two cases of cutaneous superficial mycoses were diagnosed in sirenians: a case of mixed levedurosis by *C. tropicalis* and *Trichosporon* sp., and a case of phaeohyphomycosis by *Bipolaris hawaiiensis*, as well as an outbreak of fusariomycosis (*Fusarium* sp.). Were isolated 155 strains of yeasts, being 112 from *T. inunguis* (40 *Candida albicans*, 14 *C. parapsilosis sensu stricto*, 3 *C. metapsilosis*, 4 *C. orthopsilosis*, 9 *C. guilliermondii*, 3 *C. pelliculosa*, 2 *C. tropicalis*, 2 *C. glabrata*, 1 *C. famata*, 1 *C. krusei*, 1 *C. norvegensis*, 1 *C. ciferri*, 22 *Trichosporon* sp., 6 *T.asahii*, 2 *Rhodotorula* sp. and 1 *Cryptococcus laurentii*), 29 from *T. manatus* (12 *C. albicans*, 4 *C. tropicalis*, 4 *C. famata*, 3 *C. guilliermondii*, 1 *C. krusei*, 1 *Rhodotorula* sp., 2 *R. mucilaginosa*, 1 *R. minuta*, 1 *Trichosporon* sp) and 14 from cetaceans (6 *C. tropicalis*, 2 *C. parapsilosis*, 2 *C. famata*, 1 *Candida* sp., 3 *Cryptococcus* sp). In relation to susceptibility test, minimum inhibitory concentrations (MICs) for amphotericin B ranged from 0.03 to 1µg/mL, with no resistance to this drug. The itraconazole and fluconazole MICs ranging from 0.03 to 16 µg/ml and 0.125 to 64 µg/ml, respectively, being confirmed resistance to at least one drug in 34.2% of isolates, especially *C. albicans* and *C. tropicalis*. In relation to the virulence factors, 50% produced phospholipases with high frequency in *C. albicans*; 50%, produced proteases with higher prevalence in *C. albicans* and *C. tropicalis*; and 35% produced biofilm at varying scales, with higher prevalence in *C. tropicalis* and *C. orthopsilosis*. Molecular typing was performed with 45 strains of *C. albicans*, yielding genotypes of six clades among the 18 existing for the species, varying according to the host and geographic location. This study represents a systematic and multidisciplinary approach in mycology of aquatic mammals.

Keywords: aquatic mammals, yeasts, microbiota, resistance, molecular typing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Filhote de peixe-boi-da-Amazônia com pele de aspecto rugoso, com placas sobressalentes e irregulares disseminadas por todo o corpo (A). Detalhe das lesões (B)	47
Figura 2 –	Filhote de peixe-boi marinho (08S0112/17) apresentando lesões escuras e irregulares no dorso (setas)	48
Figura 3 –	Hifas demáceas, torulóides e septadas em exame direto de lesão cutânea de peixe-boi-marinho 08S0112/17 (seta)	48
Figura 4 –	Filhote de peixe-boi-marinho apresentando lesões de coloração rosada, difusas, na região ventral do corpo	49
Figura 5 –	Filhote de peixe-boi-marinho (08S0112/19) apresentando lesões de coloração rosada, difusas, na região ventral da cabeça (círculo), regiões axilares e dobras do corpo (setas)	50
Figura 6 –	Microcultivo de <i>B. hawaiiensis</i> , mostrando conidióforos eretos com conídios apicais. No detalhe, conídio cilíndrico com cinco septos	70
Figura 7 –	Árvore filogenética apresentando agrupamentos em clados de isolados de <i>C. albicans</i> de sirênios. Em vermelho estão as cepas de <i>T. inunguis</i> , em azul as de <i>T. manatus</i> e em preto as de humanos, seguido do tipo de sequência entre parênteses.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização dos espécimes coletados de acordo com a classificação taxonômica, sexo e classe de idade.....	39
Tabela 2 – Número e porcentagem de espécies de leveduras isoladas de <i>T. inunguis</i> , <i>T. manatus</i> de acordo com o sítio anatômico	56
Tabela 3 – Número e porcentagem de espécies de leveduras e algas isoladas de cetáceos de acordo com o sítio anatômico	57
Tabela 4 – Espécies de leveduras predominantes nos sítios anatômicos de sirênios de um mesmo recinto	59
Tabela 5 – Perfil de sensibilidade aos antifúngicos de cepas de <i>Candida</i> spp. isoladas de sirênios	61
Tabela 6 – Perfil de sensibilidade a antifúngicos de cepas de <i>Candida</i> spp. isoladas de cetáceos	63
Tabela 7 – Produção de fosfolipases por cepas de <i>Candida</i> spp. isoladas de sirênios ...	64
Tabela 8 – Produção de fosfolipases por cepas de <i>Candida</i> spp. isoladas de cetáceos .	65
Tabela 9 – Produção de proteases por cepas de <i>Candida</i> spp. isoladas de sirênios	66
Tabela 10 – Produção de proteases por cepas de <i>Candida</i> spp. isoladas de cetáceos	67
Tabela 11 – Produção de biofilme por cepas de <i>Candida</i> spp. isoladas de sirênios	68
Tabela 12 – Produção de biofilme por cepas de <i>Candida</i> spp. isoladas de cetáceos	69
Tabela 13 – Perfil de alelos e número de sequências correspondente dos isolados de <i>C. albicans</i> de sirênios.....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Dados biológicos e clínicos de peixes-bois-marinho com quadro suspeito de dermatite fúngica	50
Quadro 2 –	Evolução do quadro clínico de filhotes de peixe-boi-marinho com dermatite por <i>Fusarium</i> sp.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical Laboratory and Standards Institute
DST	<i>Diploid sequencing type</i> (Tipo de sequência diploide)
FLC	Fluconazol
ITC	Itraconazol
MLST	<i>Multilocus sequencing typing</i> (Tipagem por sequenciamento de multilocus)
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SNP	<i>Single nucleotide polymorfism</i> (Polimorfismo de nucleotídeo único)
UPGMA	<i>Unweight-pair group method with aritimetic mean</i> (Agrupamento de pares não-ponderados baseado na media aritimética)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Generalidades sobre os sirênios e cetáceos	17
2.1.1	<i>Aspectos sanitários</i>	18
2.1.2	<i>Estudos sobre a microbiota bacteriana e fúngica</i>	19
2.1.3	<i>Doenças infecciosas, com ênfase nas infecções fúngicas</i>	23
2.2	Sirênios e cetáceos como sentinelas da saúde ambiental e humana	29
2.3	Resistência antimicrobiana e virulência de microrganismos de sirênios e cetáceos	31
2.4	Tipagem molecular de <i>Candida albicans</i>	34
3	HIPÓTESES	37
4	OBJETIVO GERAL	37
4.1	Objetivos específicos	37
5	MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1	Aspectos éticos e licenças ambientais	38
5.2	Animais	38
5.3	Coleta de amostras	40
5.4	Processamento microbiológico	41
5.4.1	<i>Identificação fenotípica de leveduras</i>	41
5.4.2	<i>Identificação molecular de leveduras do Complexo <i>Candida parapsilosis</i>, <i>Candida albicans</i>, gênero <i>Trichosporon</i> e</i>	42
5.5	Testes de sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i>	43
5.6	Produção de fatores de virulência	44
5.6.1	<i>Fosfolipases</i>	44
5.6.2	<i>Proteases</i>	45
5.6.3	<i>Biofilme</i>	45
5.7	Diagnóstico de doenças fúngicas	46
5.8	Tipagem de cepas de <i>Candida albicans</i> por sequenciamento de multilocus (MLST)	51
5.9	Análise estatística	53

6	RESULTADOS	54
6.1	Identificação de leveduras	54
6.1.1	Sirênios	54
6.1.1.1	<i>Trichechus inunguis</i>	54
6.1.1.2	<i>Trichechus manatus</i>	55
6.1.2	Cetáceos	57
6.2	Fatores fisiológicos e ambientais	58
6.2.1	Sirênios	58
6.2.2	Cetáceos	60
6.3	Sensibilidade <i>in vitro</i> de leveduras aos antifúngicos	60
6.3.1	Sirênios	60
6.3.2	Cetáceos	62
6.4	Fatores de virulência	63
6.4.1	Fosfolipases	63
6.4.1.1	Sirênios	63
6.4.1.2	Cetáceos	64
6.4.2	Proteases	65
6.4.2.1	Sirênios	65
6.4.2.2	Cetáceos	66
6.4.3	Biofilme	67
6.4.3.1	Sirênios	67
6.4.3.2	Cetáceos	68
6.5	Diagnóstico de doenças fúngicas	69
6.5.1	Sirênios	69
6.5.2	Cetáceos	73
6.6	Tipagem por sequenciamento de multilocus (MLST) de <i>C. albicans</i>	73
7	DISCUSSÃO	79
8	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
	ANEXOS	119

1.INTRODUÇÃO

Os mamíferos aquáticos, grupo formado pelos cetáceos, sirênios, pinípedes, algumas espécies de mustelídeos e pelo urso polar, habitam oceanos, mares, lagos, rios e estuários de todo o mundo, desde as regiões tropicais aos polos. As características anatômicas, fisiológicas, comportamentais, parâmetros de história natural e de uso de habitats variam largamente entre as distintas ordens, infraordens e famílias, tornando o estudo desses animais um desafio para a comunidade científica, mesmo nos dias atuais. Muitas espécies ainda são pouco conhecidas, o que impossibilita uma avaliação precisa sobre o seu estado de conservação e ameaças que vem sofrendo.

Os impactos das atividades humanas sobre os mamíferos aquáticos datam de muitos séculos, principalmente decorrentes da caça, o que culminou com a extinção recente de algumas espécies, como a vaca-marinha-de-Steller, o golfinho-do Yang-Tsé, a foca-monge-do-Caribe e o leão-marinho-japonês. Atualmente, os sirênios, os golfinhos de rio e a vaquita, (um pequeno golfinho confinado ao Golfo da Califórnia) são os mamíferos aquáticos que enfrentam os riscos de extinção mais iminentes, porém outras espécies também se encontram bastante ameaçadas. A atividade pesqueira, a contaminação e degradação ambiental figuram entre as principais ameaças, causando a morte de centenas de milhares de animais anualmente.

A reabilitação para fins de soltura na natureza representa uma importante ferramenta para a conservação dos mamíferos aquáticos, principalmente de espécies ameaçadas de extinção. No Brasil, o peixe-boi-marinho e o peixe-boi-da-Amazônia são as espécies mais bem estudadas em cativeiro. A manutenção desses animais no ambiente artificial requer grande especialização dos profissionais, estruturas com dimensões adequadas, boa qualidade de água e boas práticas de manejo para que se mantenham saudáveis e aptos para retornar para o ambiente natural após prolongados períodos de reabilitação.

O conhecimento sobre a sanidade dos sirênios e cetáceos é recente, sendo constante a descoberta de novas doenças que acometem esses animais, bem como de novas técnicas diagnósticas e formas de tratamento. As doenças infecciosas se destacam por representarem a principal causa de mortalidade natural de indivíduos e afetarem populações. Diversas bactérias, vírus e fungos já foram identificados como agentes etiológicos de infecções nesses animais. As atividades antrópicas podem colaborar para a ocorrência dessas doenças, uma vez que provocam estresse, imunossupressão, diminuição da oferta de alimentos e maior exposição a patógenos, principalmente nos ambientes costeiros.

Os microrganismos também desempenham importantes funções como constituintes da microbiota, habitando as superfícies corporais de praticamente todos os vertebrados. Estudos sobre a microbiota de mamíferos aquáticos são escassos e limitados a poucas espécies de hospedeiros, além de serem direcionados principalmente para a identificação de bactérias. A avaliação dos níveis de resistência aos antimicrobianos de microrganismos desses animais ainda é limitada, porém tem aplicabilidade potencial no monitoramento da contaminação e saúde ambiental.

Diante das lacunas de conhecimento sobre o papel dos fungos como constituintes da microbiota e como agentes de infecções oportunistas, sobre a ocorrência de resistência aos antifúngicos e a virulência das cepas, bem como sobre a diversidade genética de leveduras isoladas a partir de mamíferos aquáticos no Brasil, esse estudo se propôs a investigar tais aspectos em sirênios, ordem que contém as principais espécies mantidas em cativeiro para fins de conservação no país, e em cetáceos encalhados e de vida livre.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Generalidades sobre os sirênios e cetáceos

O termo mamíferos aquáticos é utilizado para designar os distintos taxa da Classe Mammalia que apresentam uma dependência do meio aquático para a realização das suas atividades vitais, como a alimentação e reprodução. Cerca de 130 espécies são assim classificadas, incluindo a Subordem Cetacea, formada pelos golfinhos, botos e baleias; a Ordem Sirenia, constituída pelos peixes-bois e dugongos; e representantes da Ordem Carnivora, como os da Subordem Pinipedia, composta pelas focas, morsas, lobos, leões e elefantes marinhos; as lontras e ariranhas da Família Mustelidae e o urso-polar na Família Ursidae (JEFFERSON et al., 2008).

Todos esses animais evoluíram a partir de ancestrais terrestres, cuja transição para o ambiente aquático exigiu adaptações anatômicas e fisiológicas significativas no tocante a natação, mergulho, manutenção da temperatura, osmorregulação, navegação e alimentação (ELSNER, 2002). Dentre os mamíferos aquáticos, apenas os sirênios e cetáceos são completamente adaptados a vida na água, visto que os pinípedes, mustelídeos e o urso polar também utilizam o meio terrestre durante o nascimento dos filhotes e para a muda de pelos (BERTA et al., 2006).

A Ordem Sirenia é composta por apenas quatro espécies viventes: os peixes-bois (*Trichechus manatus*, *T. inunguis* e *T. senegalensis*), pertencentes a família Trichechidae, e os dugongos (*Dugong dugon*), membros da família Dugongidae. São os únicos mamíferos aquáticos herbívoros, distribuindo-se em rios, estuários e mares de regiões tropicais e subtropicais de mais de 80 países em cinco continentes (MARSH et al., 2011). No Brasil ocorrem duas espécies, o peixe-boi-marinho (*T. manatus*), presente de forma descontínua no litoral das regiões norte e nordeste do país, e o peixe-boi-da-Amazônia (*T. inunguis*), que se distribui largamente na bacia amazônica (ICMBio, 2011a).

A subordem Cetacea está dividida em duas infraordens viventes: Odontoceti, representada por diversas espécies de golfinhos e baleias, que têm como características principais a presença de dentes e de um orifício respiratório; e Mysticeti, cujos representantes são as baleias verdadeiras, que possuem barbatanas e dois orifícios respiratórios. A maioria dos odontocetos se alimenta de peixes e lulas, além de camarões, caranguejos e outros invertebrados, enquanto os misticetos se alimentam de pequenos crustáceos e peixes (GEISLER

& UHEN, 2005; GERACI & LOUNSBURY, 2005). Cerca de 89 espécies, classificadas em 14 famílias, constituem essa subordem, distribuídas nos oceanos e mares de todo o mundo, além de rios, lagos e estuários (GEISLER & UHEN, 2005; JEFFERSON et al., 2008). No Brasil são registradas 46 espécies de cetáceos, porém há indícios de que outras podem ocorrer no litoral brasileiro (ICMBio, 2011b).

A maioria das espécies de mamíferos aquáticos está exposta a diversas ameaças de origem antrópica, como a captura acidental e intencional em aparelhos de pesca, caça, contaminação por poluentes, derramamentos de óleo, perda de habitat, ingestão de lixo, colisões com embarcações, uso de sonares, prospecção sísmica, dentre outras ações que provocam elevados índices de mortalidade em todo o mundo (GERACI & LOUNSBURY, 2005; FERNANDÉZ et al., 2005). A depleção de espécies e populações levou ao reconhecimento, pela comunidade científica, da necessidade de adoção de medidas para a conservação dos mamíferos aquáticos, com os primeiros movimentos iniciados apenas no século 20 (REEVES, 2002). Em geral, a conservação de animais selvagens requer o conhecimento sobre padrões biogeográficos, estruturas de comunidades, dinâmica de populações e comportamento individual. No entanto, outro fator essencial para o delineamento dessas medidas é a compreensão dos problemas de saúde que afetam esses animais na natureza (DEEM et al., 2001).

2.1.1 Aspectos sanitários

Os mamíferos aquáticos também estão sujeitos a diversas injúrias naturais que afetam a sua saúde, tais como falhas reprodutivas, fome, traumas, infestações parasitárias, infecções microbianas, tumores, biotoxinas, predação, doenças metabólicas, dentre outras (GERACI & LOUNSBURY, 2002; BOSSART et al., 2004).

O conhecimento sobre a sanidade dos mamíferos aquáticos tem sido limitado tanto pelas dificuldades inerentes ao seu estudo na natureza, como pelas suas características biológicas únicas (GERACI & LOUNSBURY, 2002). Os encalhes representam uma importante fonte de material biológico para avaliação da sanidade de populações selvagens. No entanto, a avaliação de carcaças é limitada devido à ausência de informações sobre a história de vida dos espécimes, da região geográfica de origem e por representarem apenas uma parcela da mortalidade que ocorre no mar (PELTIER et al., 2012).

A base do conhecimento sobre a saúde dos cetáceos e sirênios provem do cativeiro, incluindo a determinação de parâmetros clínicos e hematológicos, perfis hormonais e sorológicos, diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas, parasitárias e não-infecciosas, dentre outros (DIERAUF & GULLAND, 2001). Programas de captura para avaliação do status de saúde de algumas espécies de mamíferos marinhos selvagens são desenvolvidos em alguns locais do mundo, principalmente com golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) e peixe-boi-da-Flórida (*T. manatus latirostris*) nos Estados Unidos. No Brasil, destacam-se as capturas científicas de botos-vermelho (*Inia geoffrensis*) realizadas sistematicamente desde a década de 90 na Amazônia, nas quais são realizados estudos multidisciplinares sobre história natural, ecologia, comportamento, fisiologia, taxonomia, genética populacional (DA SILVA & MARTIN, 2000; GRAVENA et al. 2009) e, recentemente, sobre a sanidade desses animais. Nessas ocasiões são realizadas extensas coletas de material biológico para avaliações hematológicas, bioquímicas séricas, sorológicas, microbiológicas, toxicológicas, parasitológicas, imunológicas e hormonais, que possibilitam um conhecimento em escala geográfica e temporal sobre a situação de populações (BONDE et al, 2012; FAIR et al., 2014)

Métodos não-invasivos para avaliação da saúde de cetáceos e sirênios vem sendo empregados em diversos países. Fotografias de animais em vida livre tem sido utilizadas para diagnóstico de lesões cutâneas, sejam de origem infecciosa, de interações interespecíficas e intraespecíficas, de predadores, bem como provocadas por ações antrópicas (ROTSTEIN et al., 2009; GROCH, 2014). Outro método não-invasivo que vem sendo utilizado recentemente, principalmente com grandes baleias na natureza, consiste no isolamento de microrganismos do condensado do ar exalado para monitoramento de doenças respiratórias infecciosas, bem como para avaliação da microbiota (ACEVEDO-WHITEHOUSE et al., 2010).

2.1.2 Estudos sobre a microbiota bacteriana e fúngica

A microbiota consiste em comunidades complexas de microrganismos que habitam superfícies corporais de praticamente todos os vertebrados, relacionada filogeneticamente com seus hospedeiros como resultado de milhões de anos de co-evolução (HOOPER et al., 2012; NELSON et al., 2015). Bactérias, arqueas, vírus e fungos constituem essas comunidades, que estão distribuídas na pele e anexos, cavidade oral, vias aéreas, genitais e trato gastrointestinal (RAJILIC-STOJANOVIC et al., 2013, CONSORTIUM HMP, 2012). Nos seres humanos, a composição dessas comunidades é extremamente diversa e abundante, visto que existem cerca

de 100 trilhões de células microbianas em comparação com 10 trilhões de células humanas num indivíduo (KNIGHTS et al., 2011; CONSORTIUM HMP, 2012).

A formação da microbiota dos mamíferos se inicia no momento do nascimento. Os animais vivíparos nascem de um ambiente uterino estéril e rapidamente são colonizados no canal do parto pela microbiota vaginal da mãe. À medida que se desenvolvem, relações ecológicas complexas levam à colonização dos indivíduos por uma grande diversidade de microrganismos que irão constituir a microbiota. Todos os indivíduos saudáveis carregam uma microbiota residente, que é aquela constituída por microrganismos encontrados com regularidade numa faixa etária, em determinada área, recomposta facilmente após perturbações; e a microbiota transitória, que é formada por microrganismos não-patogênicos ou oportunistas, que permanecem em determinada área por tempo limitado, não provocando doença e não se estabelecendo definitivamente (DOMINGUÉZ-BELO et al., 2010; ROSENTHAL et al., 2011).

No intestino, esses microrganismos utilizam componentes indigeríveis dos alimentos e substratos derivados de seus hospedeiros (muco, enzimas e células epiteliais) e os convertem em vários metabólitos. Os efeitos desses metabólitos microbianos podem ser tanto de promoção da saúde, incluindo uma melhor digestão, a síntese de vitaminas, a inibição do crescimento de patógenos e a imunestimulação, como prejudiciais, uma vez que podem sintetizar componentes carcinogênicos e toxinas, e contribuir para o desenvolvimento de diarreia, constipação e infecções intestinais (RAJILIC-STOJANOVIC et al., 2013). Nos animais herbívoros, a energia produzida pelo metabolismo dos microrganismos corresponde a uma grande porcentagem do requerimento calórico diário, equivalente a cerca de 70% nos ruminantes, por exemplo (BERGMAN, 1990). Na pele, o órgão mais exposto em todos os animais, os microrganismos comensais possuem importante papel para a formação de barreiras físicas, inibição do crescimento de patógenos por meio da competição por nutrientes e espaço, produção de componentes antimicrobianos e estimulação da resposta imune contra patógenos (SANFORD & GALLO, 2013)

Os primeiros estudos sobre a caracterização da microbiota de mamíferos aquáticos datam da década de 80, utilizando técnicas clássicas de cultivo microbiológico (VEDROS et al., 1982). Nos últimos anos, técnicas moleculares, como pirosequenciamento, também vem sendo utilizadas para identificação do grande número de microrganismos que compõem a microbiota dos seres humanos e de animais, incluindo peixes-bois, dugongos, golfinhos e grandes baleias (EIGELAND et al., 2012; LIMA et al., 2012; MERSON et al., 2013; APPRILL et al., 2014).

Os primeiros estudos sobre a microbiota de sirênios foram realizados por Vergara-Parente et al. (2003), que descreveram a composição da microbiota do trato respiratório superior de *T. manatus* no Brasil, sendo isolados sete gêneros e 24 espécies de bactérias, sem isolamento de leveduras. Nesse estudo foi observada uma diferença qualitativa e quantitativa de bactérias provenientes de animais mantidos em cativeiro, com maior predominância de Gram-negativas, quando comparados com espécimes mantidos em sistema de cativeiro no ambiente natural, nos quais predominaram as Gram-positivas, demonstrando a influência dos fatores ambientais sobre as comunidades microbianas. Attademo (2014) identificou 17 espécies e gêneros de bactérias da microbiota das cavidades naturais de *T. manatus*, também no Brasil. Tsukinowa et al. (2008), obtiveram sequências de DNA de bactérias pertencentes a seis filos, com elevada prevalência de Firmicutes, na microbiota fecal de um dugongo, sugerindo inclusive a descoberta de bactérias nunca antes identificadas.

Eigeland et al. (2012) e Merson et al. (2013) utilizaram o pirosequenciamento para identificar a microbiota intestinal de *D. dugong* e *T. manatus* na Austrália e Flórida, respectivamente. Obtiveram 106 e 2027 unidades taxonômicas operacionais de bactérias, respectivamente, com prevalência similar dos filos Firmicutes e Bacteroides nas duas espécies. Os gêneros *Roseburia*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Sedimentibacter* e *Ruminococcus* foram predominantes nos dugongos selvagens, que apresentaram microbiota mais diversa do que animais de cativeiro, e com diferentes composições entre animais de faixas etárias distintas (EIGELAND et al., 2012). No peixes-bois-da Flórida o gênero *Clostridium* foi o mais prevalente e a microbiota intestinal se mostrou influenciada pela estação do ano e disponibilidade de alimentos (MERSON et al., 2013).

Dentre os cetáceos, o golfinho-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*) é a espécie mais bem estudada e que possui sua microbiota melhor caracterizada, tanto em populações de vida livre, como em cativeiro (BUCK et al., 2006; AVALOS-TELEZ et al., 2010; LIMA et al., 2012). Buck et al. (2006) caracterizaram a microbiota respiratória e fecal de *T. truncatus* capturados na Flórida para avaliação da saúde durante doze anos, demonstrando elevada prevalência de *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio damsela*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas* sp. Em estudo similar realizado por Morris et al. (2011) em outras regiões dos Estados Unidos, as bactérias mais prevalentes foram *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus* sp. e estafilococos coagulase-negativos. LIMA et al. (2012), avaliaram a microbiota respiratória por método não-invasivo em

Tursiops spp. de cativeiro e encontraram 3441 unidades taxonômicas operacionais de 19 filos de bactérias, com elevada prevalência de *Sutonella* sp.

O pirosequenciamento também tem sido utilizado para identificação da microbiota de grandes baleias. Ogawa et al. (2010) coletaram amostras fecais de baleias-minke (*Balaenoptera acutorostrata*) vítimas da caça científica praticada pelo Japão, e demonstraram uma maior prevalência dos gêneros *Enterococcus*, *Enterobacter* e *Clostridium*, bem como das espécies *E. coli* e *Edwardsiella ictaluri*. Appril et al. (2014) realizaram biopsias de pele e caracterizaram a microbiota de baleias-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) de diversas partes dos Oceanos Atlântico e Pacífico. Obtiveram elevada prevalência dos gêneros *Tenacibaculum* e *Psychrobater*, porém com significativa variação da comunidade bacteriana de acordo com a região geográfica e condição corporal dos animais.

Apesar de muitas espécies de leveduras serem importantes agentes de infecções oportunistas, estas também constituem a microbiota de seres humanos e animais e desempenham importante papel como probióticos, fonte vitaminas do complexo B, proteínas, minerais e aminoácidos essenciais. Além disso, os componentes polissacarídicos da parede celular das leveduras regulam o sistema imune e possuem atividade antibacteriana, influenciando no estabelecimento das comunidades microbianas (URUBSCHUROV & JANCZYK, 2011). A biodiversidade de leveduras que constituem a microbiota tem sido investigada em diversas espécies de vertebrados, sendo os gêneros *Candida*, *Trichosporon*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* mais comumente descritos (BRITO et al., 2009; BRILHANTE et al., 2010; URUBSCHUROV & JANCZYK, 2011; BRILHANTE et al., 2012; BRILHANTE et al., 2013).

Assim como no estudo da microbiota bacteriana, a espécie de cetáceo que possui a microbiota fúngica melhor caracterizada é *T. truncatus*. Além das bactérias descritas no item anterior, Buck et al (2006) isolaram os fungos *Aureobasidium* sp., *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. glabrata*, *Rhototorula* sp. e *Trichosporon cutaneum*, com prevalência de 6,3% para as leveduras. Morris et al. (2011) isolaram *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *Cunninghamella bertholletiae* e *Trichosporon beigeli* de golfinhos de outras regiões dos Estados Unidos. Um maior percentual de isolamento de *Candida* spp. de amostras gástricas foi obtido de animais classificados como doentes. Com relação aos animais mantidos em cativeiro, *C. albicans* se mostra como a espécie mais prevalente em oceanários de alguns países, além de

isolados de *C. tropicalis*, *C. paraspilosis* e *C. glabrata* (BUCK et al., 1980; REIDARSON et al., 2001, TAKAHASHI et al., 2010).

Não existem estudos sistemáticos demonstrando o isolamento de fungos da microbiota de sirênios. Apenas o trabalho de Nielsen et al. (2013) revelou isolamento de leveduras a partir de carcaças de dugongos na Austrália, no qual obtiveram duas cepas de *Candida* spp., sendo uma da pele e outra das fezes, e uma cepa de *Cryptococcus humicolus* das narinas.

2.1.3 Doenças infecciosas, com ênfase nas infecções fúngicas

Os mamíferos aquáticos estão expostos a uma grande variedade de agentes infecciosos no ambiente natural, incluindo bactérias, vírus e fungos (COWAN, 2002). A maioria desses microrganismos coexiste com os animais sem causar prejuízos à saúde, alguns fazem parte da microbiota, enquanto outros são oportunistas (HIGGINS, 2000; COWAN et al, 2002). Poucos são essencialmente patogênicos, causando doenças graves e fatais (GERACI & LOUNSBURY, 2002).

As doenças infecciosas representam a principal causa de mortalidade natural de mamíferos aquáticos (COWAN, 2002). A linha tênue entre a infecção e a doença depende da virulência do organismo e susceptibilidade do hospedeiro, determinada pelo contato prévio com o agente e pelo status imunológico do animal (GERACI & LOUNSBURY, 2002). Fatores ambientais também exercem um papel fundamental na ocorrência de infecções, tais como temperatura da água, contaminação por fontes terrestres, efluentes de rios, dentre outros, sendo as espécies costeiras as mais comumente afetadas (GERACI & LOUNSBURY, 2002; BOSSART, 2007).

Doenças infecciosas emergentes, tais como a morbilivirose, poxvirose, papilomatose, brucelose e lobomicose, têm sido relatadas em várias espécies de mamíferos aquáticos em todo o mundo, causando mortalidades massivas, afetando a reprodução, provocando doenças de pele desfigurantes e, em alguns casos, zoonoses. Dessa forma, essas doenças podem afetar o crescimento de populações selvagens e aumentar o risco de extinção de populações pequenas, que aliados a outros fatores antrópicos, podem provocar a perda de biodiversidade (VAN BRESSEM et al., 2009).

Os primeiros relatos de doenças bacterianas em sirênios datam da década de 70, descritos tanto em animais de vida livre como em espécimes cativos (FORRESTER, 1992). As bactérias são os principais agentes infecciosos diagnosticados em peixes-bois e dugongos, com

destaque para os gêneros *Aeromonas*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus* e *Mycobacterium*, os quais estão relacionados a quadros de pneumonias, dermatites, abscessos, septicemias, enterocolites, onfalites, peritonites, osteomielite, meningoencefalite, dentre outros. (FORRESTER, 1992; SATO et al., 2003; VERGARA-PARENTE et al., 2003b, BOSSART et al., 2004; D’AFFONSECA-NETO & VERGARA-PARENTE, 2007; NIELSEN et al., 2013; ATTADAMO, 2014). Dentre as doenças virais, destaca-se a papilomatose cutânea causada por papilomavírus TmPV1 em *T. manatus* (WOODRUFF et al., 2005) e por cinco novos papilomavirus em *T. inunguis*, detectados em animais cativos (GRAVENA et al., 2012).

Assim como nos sirênios, as bactérias são os principais agentes infecciosos diagnosticados em cetáceos, causando quadros clínicos diversos, variando desde infecções cutâneas a sepse (DUNN et al., 2001). Dentre as infecções bacterianas mais comuns, destacam-se aquelas causadas por *Actinobacillus* sp., *Brucella* sp., *Vibrio* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Helicobacter* sp., *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia* sp., *Leptospira* sp., *Mycobacterium* sp., *Mycoplasma* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp (HIGGINS, 2000; DUNN et al., 2001). Diversas doenças virais tem sido diagnosticadas em cetáceos, sendo o *Morbillivirus* um dos agentes mais importantes, implicado em epizootias, com mortalidades massivas de golfinhos em diversas partes do mundo (VAM BRESSEM et al., 2009). Infecções por *Poxvirus*, *Papillomavirus*, *Adenovirus*, *Herpesvirus*, *Calicivirus* e *Influenzavirus* também são relatadas, causando lesões de pele, hepatites, encefalites, pneumonias e doenças sistêmicas e fatais (KENNEDY-STOSKOPF, 2001; VAM BRESSEM et al., 2009).

As infecções fúngicas são pouco relatadas e diagnosticadas em mamíferos aquáticos, porém são observadas em animais encalhados e de cativeiro (REIDARSON et al., 2001). Apesar da baixa prevalência, quando comparados a outros agentes infecciosos, os fungos podem causar infecções severas e sistêmicas de difícil tratamento, muitas vezes fatais (MIGAKI & JONES, 1983; MOUTON et al., 2009). As condições ambientais artificiais, o uso prolongado de antibióticos e de corticosteróides, a composição da água inadequada, a ação irritativa do cloro sobre as mucosas e o contato com animais terrestres, seres humanos e flora circundante são fatores que favorecem a maior prevalência desses agentes no ambiente cativo (BUCK, 1980; MARTINS et al., 2002). No ambiente natural, outras condições imunossupressoras, tais como infecções concomitantes por *Morbillivirus*, má nutrição, estresse de origem natural e antrópica, exposição persistente a contaminantes químicos, dentre outras, favorecem a

ocorrência de doenças e o crescimento de fungos oportunistas que fazem parte da microbiota (TOWNSEND, 1999; BOSSART, 2007).

A maioria das espécies envolvidas na etiologia de micoses em mamíferos aquáticos são saprófitas ou fazem parte da microbiota normal. Esses agentes invadem os hospedeiros através de inalação, trauma ou ingestão. No entanto, por serem pouco transmissíveis entre os animais, as micoses raramente se manifestam de forma epidêmica. Em geral, os sinais clínicos de doenças fúngicas são inespecíficos, com curso variando de crônico a fulminantes. Nos casos de micoses oportunistas, as alterações hematológicas e bioquímicas são indistinguíveis daquelas provocadas por bactérias. Exames de imagem também são importantes para auxiliar no diagnóstico. Biópsias, aspirados, raspados, lavados broncoalveolares são procedimentos essenciais no diagnóstico de micoses em animais vivos. A maioria dos casos é diagnosticada apenas durante a realização de necropsias, nas quais as lesões macroscópicas são observadas, e o cultivo e/ou análises moleculares são realizados para identificação dos agentes envolvidos (REIDARSON et al., 2001).

Entre os sirênios são raros os relatos de infecções fúngicas (REIDARSON et al. 2001; BOSSART, 2007). Dilbone (1965) descreveu um caso de dermatofitose por *Epidermophyton floccosum* em peixe-boi (*Trichechus* sp.) mantido em cativeiro, causando erosões na pele do focinho, cabeça e nadadeiras. Forrester (1992) listou casos de dermatites pustulares por *Fusarium* sp. e *Blastomyces dermatitidis* em *T. manatus* cativos. Tabuchi et al, (1974) descreveram casos de dermatite por *Cephalosporium* sp. e *Mucor* sp. em quatro peixes-bois mantidos em cativeiro no Japão, nos quais foram observadas pápulas esbranquiçadas em torno da abertura genital, região abdominal e dorso. Não existem relatos publicados sobre infecções por leveduras em sirênios.

Um maior número de casos de micoses tem sido descrito em cetáceos do que em outros mamíferos aquáticos, incluindo aquelas causadas por leveduras, fungos filamentosos e fungos dimórficos (REIDARSON et al., 2001; HIGGINS, 2000). As candidíases são as micoses mais frequentes, sendo a espécie *C. albicans* a mais comum, implicada em casos de pneumonias, dermatites, esofagites, gastrite, infecção das mucosas e infecções disseminadas (MIGAKI, 1987; HIGGINS, 2000; MARTINS et al., 2002). As espécies de cetáceos mantidas em cativeiro são mais comumente afetadas, como *T. truncatus*, *Orcinus orca* (orca), *Pseudorca crassidens* (falsa-orca) e *Delphinapterus leucas* (beluga), porém outros casos envolvendo cetáceos selvagens já foram diagnosticados. *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. ciferri*, *C. glabarata*, dentre outras, também já foram isoladas, causando lesões no espiráculo, sistema

nervoso central, pulmões e candidemias (HIGGINS, 2000; REIDARSON et al., 2001; MARTINS et al., 2002). Infecção cutânea por *C. zeylanoides* já foi diagnosticada em neonato de *Eubalena australis* (baleia-franca) encalhado na África do Sul (MOUTON et al., 2009).

Outro gênero de levedura de importância médica para os cetáceos é *Cryptococcus* sp., o qual pode causar dermatite, pneumonia, pleurite, encefalite, meningite e infecções disseminadas, diagnosticadas principalmente em exames necroscópicos (GALES et al., 1985; REIDARSON et al., 2001; ROTSTEIN et al., 2010; NORMAN et al., 2011). Infecções pulmonares por *C. neoformans* já foram observadas em *T. truncatus* e *Lagenorhynchus obliquidens* (Golfinho-de-laterais-brancas-do-Pacífico) mantidos em cativeiro, adquiridas possivelmente pela proximidade com aves marinhas do recinto (HIGGINS, 2000; REIDARSON et al., 2001), e em *Stenella coeruleoalba* (golfinho-listrado) de vida livre (GALES et al., 1985). Pneumonias causadas por *C. laurentii* foram diagnosticadas em *T. truncatus* em cativeiro (MARTINS et al., 2002). A transmissão materno-fetal de *C. gatti* foi comprovada em necrópsia de fêmea grávida de *Phocoena phocoena* (Boto-do-porto) encalhada no Canadá, com isolamento de leveduras a partir do líquido amniótico, placenta, tecidos maternos e fetais (NORMAN et al., 2011). Outras espécies selvagens, como *Phocoenoides dalli* (Boto-de-Dall) e *Stenella longirostris* (golfinho-rotador) podem ser afetadas também (ROTSTEIN et al., 2010; NORMAN et al., 2011).

Dentre as micoses causadas por fungos filamentosos, as aspergiloses apresentam a maior prevalência. As infecções são contraídas pela inalação de conídios, podendo se manifestar como aspergilose alérgica, aspergilose necrotizante crônica, aspergilomas ou infecções disseminadas (REIDARSON et al., 2001). *Aspergillus fumigatus* é a principal espécie envolvida, porém casos de infecções por *A. niger* e *A. terreus* já foram diagnosticadas em cetáceos, tanto de vida livre como mantidos em cativeiro (HIGGINS, 2000). Lesões pulmonares por *A. fumigatus* já foram observadas em *T. truncatus*, *Cephalorhynchus commersonii* (Golfinho-de-Commerson), *Lissodelphis borealis* (golfinho-liso-do-norte), *Mesoplodon carlhubbsi* (baleia-bicuda-de-Hubbs) e *Peponocephala electra* (golfinho-cabeça-de-melão), enquanto lesões cerebrais fatais foram diagnosticadas em *O. orca*, *D. leucas* e *S. coeruleoalba*, *T. truncatus*, *P. phocoena* e *Hyperoodon ampullatus* (baleia-bicuda-de-cabeça-plana-do-norte) (JOSEPH et al., 1986; DOMINGO et al., 1992; REIDARSON et al., 2001; DAGLEISH et al., 2006; DAGLEISH et al., 2008; TORNO et al., 2008). Quatro casos de traqueíte oclusiva fatais por *A. fumigatus* foram relatados em *T. truncatus* de cativeiro (DELANEY et al., 2012).

Um caso de otite média por *A. terreus* foi observado em *P. phocoena* encalhada no Reino Unido (PRAHL et al., 2010).

Outros fungos filamentosos reportados principalmente como agentes de infecções cutâneas são os do gênero *Fusarium*. Dentre os hospedeiros afetados encontram-se as espécies *Kogia breviceps* (cachalote-pigmeu) e *Lagenorhynchus acutus* (golfinho-de-laterais-brancas-do-Atlântico), nos quais foram observados nódulos cutâneos firmes, eritematosos, causados por *Fusarium* spp., tratados eficazmente com cetoconazol (FRASCA et al. 1996). Uma beluga mantida em cativeiro foi tratada por mais de um ano com diversas combinações de derivados azólicos e alilaminas para um nódulo cutâneo firme na nadadeira peitoral causado por uma cepa de *F. solani* multirresistente (NAPLES et al., 2012). Um caso de meningoencefalite fatal por *F. oxysporum* foi diagnosticado em filhote de *T. truncatus* nascido em cativeiro, enquanto *F. moniliforme* ocasionou lesões similares em uma orca (STAGGS et al., 2010).

Há ainda alguns relatos de micoses por fungos dimórficos em cetáceos. Infecções por *Histoplasma capsulatum* com manifestações pulmonares, gástricas e disseminadas foram reportadas em *P. crassidens*, *L. obliquidens* e *T. truncatus*, respectivamente (JENSEN et al., 1998; REIDARSON et al., 2001). Um caso de infecção disseminada por *Blastomyces dermatitidis* foi relatado em *T. truncatus* mantido em cativeiro, havendo inclusive a transmissão para o veterinário responsável pelo tratamento do animal (CATES et al., 1986). Apenas um caso de esporotricose cutânea por *Sporothrix schenckii* foi diagnosticada em *L. obliquidens* mantido em cativeiro, no qual foram observadas lesões ulceradas na pele, hemorragias nos pulmões e mucosa oral (MIGAKI, 1987). Infecção disseminada por *Coccidioides immitis* foi registrada em *T. truncatus* encalhado na Califórnia, Estados Unidos, no qual foram observados nódulos caseosos nos pulmões e linfonodos (REIDARSON et al., 1998)

A lobomicose, doença causada pelo fungo dimórfico não-cultivável *Lacazia loboi* (Ordem Onygenales), vem adquirindo grande importância epidemiológica por afetar golfinhos em diversas partes do mundo, causando lesões de pele desfigurantes (VAM BRESSEM et al., 2009). As lesões são caracterizadas por granulomas cutâneos e subcutâneos, que podem ser ulcerados, formar placas extensas, e estar presentes em qualquer parte do corpo dos animais, contendo estruturas leveduriformes ligadas em cadeia no seu interior (BERMUDEZ et al., 2009; ROTSTEIN et al., 2009). Inicialmente essa micose era registrada apenas em seres humanos e golfinhos em regiões tropicais da América do Sul e América Central (MIGAKI, 1987; HIGGINS, 2000). O primeiro caso em cetáceos foi descrito a partir de exames histopatológicos de lesão de pele de um *Sotalia fluviatilis* (tucuxi) encalhado nas Guianas (DE VRIES &

LAARMAN, 1973). A transmissão de *L. loboi* foi reportada em um treinador de golfinhos-nariz-de-garrafa que cuidava de um animal doente em cativeiro (SYMMERS, 1983). Lesões similares àsquelas observadas na lobomicose já foram relatadas em *T. truncatus* nos Estados Unidos (Flórida, Carolina do Norte e Texas), Japão e Cuba (ROTSTEIN et al., 2009; ESPERÓN et al., 2012; UEDA et al., 2013). No entanto, nos casos de animais resgatados na Carolina do Norte, o diagnóstico molecular não pôde ser confirmado, pois houve similaridade de 97% das sequências do rDNA com *Lacazia* sp., *Paracoccidioides* sp. e *Emmonsia* spp. (ROTSTEIN et al., 2009). O diagnóstico molecular também não foi confirmado nos casos relatados no Japão, visto que houve homologia de 94% na sequência do gene *gp43* com *Paracoccidioides brasiliensis* e de 84% para *L. loboi*, sendo descrito como um genótipo diferente do agente presente na região amazônica (UEDA et al., 2013). Esperón et al. (2012) sugeriram que outro fungo da Ordem Onygenales pode estar envolvido na etiologia dessa doença, visto que as sequências do rDNA extraídas a partir de lesões de animais mantidos em cativeiro na Espanha, porém provenientes de Cuba, apresentaram maior similaridade com *P. brasiliensis* do que com *L. loboi*. Lesões descritas como “*lobomycosis-like-disease*” vem sendo observadas em cetáceos de vida livre e encalhados em diversas partes do mundo, incluindo *Sotalia guianensis* (boto-cinza) no Brasil, Colômbia, Peru e Equador; *T. truncatus* nos Estados Unidos e Venezuela; e *T. aduncus* (golfinho-nariz-de-garrafa-do-Índico) entre Moçambique e Madagascar e no Japão (BERMUDEZ et al., 2009; KISZKA et al., 2009; VAM BRESSEM et al., 2009; TAJIMA et al., 2015).

Infecções causadas por zigomicetos normalmente estão restritas a pele e tecido subcutâneo, porém lesões disseminadas já foram relatadas em cetáceos (REIDARSON et al., 2001; ABDO et al., 2010). Um caso de zigomicose causada por *Mucor* sp. foi relatado em *E. australis* na África do Sul, sendo observados nódulos granulomatosos contendo hifas na musculatura epaxial (BEST & MC CULLY, 1979). Mucormicose no sistema nervoso central causada por *Cunninghamella bertholletiae* foi relatada em *T. truncatus* encalhado na costa da Espanha (ISIDORO-AYZA et al., 2014). Infecções disseminadas por *Apophysomyces elegans* foram descritas em *T. truncatus*, *L. obliquidens* e *L. acutus* mantidos em cativeiro, afetando o trato gastrintestinal, pulmões, coração, tecido subcutâneo e músculos esqueléticos (HIGGINS, 2000; REIDARSON et al., 2001; ROBECK & DALTON, 2002). Dois casos de infecção disseminada por *Saksenaia vasiformis*, iniciadas a partir de lesões cutâneas, foram observadas em *O. orca* e *T. truncatus* em cativeiro, afetando músculos, pulmões, sistema nervoso central e útero (ROBECK & DALTON, 2002). Um caso de infecção disseminada causada

concomitantemente por *Mucor* sp. e *Aspergillus* sp. foi relatado em uma orca diagnosticada previamente com herpesvírus, sendo observados granulomas fúngicos na musculatura esquelética, coração e pulmões (ABDO et al., 2010). Um relato de infecção no cérebro, pulmões, rins e testículos causada por *Rhizopus* sp. foi descrito em *P. phocoena* encalhada na Alemanha (WUNSCHMANN et al., 1999).

2.2 Sirênios e cetáceos como sentinelas da saúde ambiental e humana

A palavra sentinela, derivada do latim *sentire*, significa aquele que sente ou percebe. Um animal sentinela é aquele em que dados sobre a exposição a contaminantes no meio ambiente são coletados sistematicamente e analisados para indicar riscos potenciais à saúde de outros animais e seres humanos (REDDY et al., 2001). Os mamíferos aquáticos são uns dos melhores organismos sentinelas da saúde dos ambientes aquáticos e dos seres humanos, por serem animais longevos, que ocupam um elevado nível trófico na cadeia alimentar e que possuem uma espessa camada de gordura subcutânea que atua como depósito para diversas toxinas antropogênicas (BOSSART, 2006; BOSSART, 2011).

Contaminantes de origem industrial, urbana e da atividade agrícola são escoados para os ambientes aquáticos, onde se misturam e bioacumulam na cadeia alimentar (REDDY et al., 2001). Dentre essas substâncias, destacam-se os organoclorados, metais pesados e hidrocarbonetos, que podem atingir elevadas concentrações nos tecidos de sirênios e cetáceos. Estes poluentes estão intimamente relacionados a imunossupressão, falhas reprodutivas, distúrbios endócrinos, neurológicos e, conseqüentemente, ao surgimento de doenças infecciosas e neoplasias (BOSSART, 2011).

VENN-WATSON et al. (2015) analisaram tecidos das glândulas adrenais e pulmões de golfinhos-nariz-de-garrafa encalhados mortos entre os anos de 2010 e 2014 durante evento de mortalidade atípica ocorrido nos estados americanos de Luisiana, Mississippi e Alabama. Durante esse período, especificamente em abril de 2010, ocorreu o derramamento de óleo no Golfo do México, que ficou mundialmente conhecido como *Deepwater Horizon oil spill*. As análises histopatológicas, imunohistoquímicas e moleculares revelaram maior susceptibilidade a pneumonias bacterianas e redução do córtex adrenal dos animais, achados relacionados com a inalação e aspiração de componentes do petróleo ou a distúrbios no sistema imune.

MOUTON et al. (2015) observaram uma correlação positiva entre os níveis de alumínio encontrados nos tecidos de 40 falsas-orcas encalhadas em massa na costa da África do Sul com

a colonização da pele por fungos, possivelmente devido à imunotoxicidade. Dos 22 isolados, 18 eram fungos clinicamente relevantes para a saúde humana, com destaque para os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Candida*, *Chaetomium*, *Alternaria*, *Chrysosporium*, *Emericella*, *Penicillium*, *Pseudallescheria* e *Trichoderma*.

O escoamento de dejetos de atividades humanas e da produção animal também favorece a proliferação de algas tóxicas, pois aumentam os níveis de nutrientes nos ambientes aquáticos. Diversas espécies de algas produtoras de toxinas, como *Karenia brevis* (brevetoxina), *Alexandrium* spp. (saxitoxina), *Pseudonitzschia australis* (ácido domóico), dentre outras, estão implicadas em mortalidades massivas de golfinhos, leões-marinhos, baleias e peixes-bois, e põem em risco a saúde humana (BONDE et al., 2004; GERACI & LOUNSBURY, 2005; BOSSART, 2011).

Outro aspecto relevante sobre o uso desses animais como sentinelas consiste na emergência e reemergência de doenças infecciosas nas últimas décadas, o que está intimamente relacionado a fatores antropogênicos (BOSSART, 2007). A degradação ambiental, incluindo a contaminação química e biológica, mudanças climáticas, impactos da pesca, poluição sonora e tráfego de embarcações, podem comprometer a função imune de populações e diminuir a oferta de alimentos, aumentando o estresse e favorecendo a introdução de patógenos exóticos (VAN BRESSEM et al., 2009). Essas doenças refletem a deterioração da saúde dos ecossistemas aquáticos e podem ter relevância direta ou indireta sobre a saúde humana, uma vez que muitos desses microrganismos podem apresentar potencial zoonótico (BOSSART, 2007; BUREK et al., 2008; BOSSART, 2010).

A compreensão do potencial zoonótico existente nas relações entre os seres humanos e mamíferos aquáticos é recente (COWAN et al., 2001). O risco de aquisição de doenças a partir desses animais era uma preocupação apenas para pessoas que caçavam e consumiam a sua carne, realidade ainda presente nos países onde a caça de subsistência é praticada (MOORE et al., 2008). Nas últimas décadas houve uma mudança nesse cenário, tendo em vista que a caça comercial foi proibida em muitos países e surgiram diversos parques aquáticos, oceanários e centros de reabilitação que mantêm mamíferos aquáticos em cativeiro, aumentando o contato das pessoas com esses animais. Assim profissionais envolvidos no manejo, como biólogos, veterinários, treinadores e tratadores são os grupos mais expostos aos riscos de transmissão de zoonoses (HUNT et al., 2008). Além disso, carcaças encalhadas nas praias representam uma importante fonte de contaminação para pesquisadores e para a população (WALTZEK et al., 2012).

Adicionalmente, o contínuo crescimento das populações humanas nas zonas costeiras torna os ecossistemas marinhos importantes reservatórios de agentes infecciosos, oriundos principalmente da atividade agrícola e do descarte inadequado de resíduos humanos e animais. Surto de doenças infecciosas e eventos de mortalidade em seres humanos e animais selvagens aumentam as conexões entre os diversos taxa e ecossistemas, favorecendo a transmissão de zoonoses (BOGOMOLNI et al., 2008). As principais doenças transmitidas pelo contato com mamíferos aquáticos são: tuberculose, leptospirose, brucelose, erisipela, salmonelose e infecções por *Mycoplasma* sp., *Vibrio* sp., *Staphylococcus* sp., *Calicivirus*, *Influenza* e *Poxvirus* (HUNT et al., 2008; WALTZEK et al., 2012).

2.3 Resistência a antimicrobianos e virulência de microrganismos de sirênios e cetáceos

Além da importância como agentes etiológicos de doenças infecciosas, incluindo algumas zoonoses, o aumento na prevalência de microrganismos resistentes a antimicrobianos é um problema de saúde pública tanto para os seres humanos como para os animais. A proliferação dessas bactérias e fungos no ambiente demonstra a extensão da resistência além das fronteiras dos hospitais e pode indicar a existência de múltiplas fontes de exposição e formas de transferências de cepas resistentes a outras populações não-alvo (SCHAEFFER et al., 2009). Uma vez persistentes no ambiente, o material genético desses microrganismos pode ser repassado para outros através de diversos mecanismos, aumentando sua ocorrência na natureza (KRUSE & SORUM, 1994).

O isolamento de bactérias e fungos resistentes a partir de mamíferos aquáticos de vida livre tem sua origem principalmente na contaminação dos ambientes costeiros com dejetos de atividades humanas, pecuárias e agrícolas (REDDY et al., 2001; SCHAEFFER et al., 2009; BOSSART et al., 2010). Adicionalmente, a exposição crônica desses animais à doses subtóxicas contaminantes químicos, potencialmente mutagênicos, pode induzir alterações fenotípicas nos microrganismos que compõem a microbiota devido à superexpressão e/ou mutação gênica, provocando resistência cruzada (ZANELLA et al., 2003; ROSE et al., 2009).

A resistência a múltiplos antibióticos tem sido detectada em bactérias isoladas de algumas espécies de mamíferos aquáticos, porém estudos sistemáticos ainda são escassos quando comparados aos dados existentes para animais terrestres (ROSE et al., 2009). Existem relatos pontuais de resistência aos antimicrobianos em patógenos isolados de animais mantidos em cativeiro, detectada principalmente em antibiogramas. Antibióticos são largamente

utilizados em nesses animais mantidos em cativeiro, tanto de forma profilática como para tratamento de diversas doenças bacterianas, o que pode favorecer a ocorrência do fenômeno de resistência (DUNN et al., 2001; REIDARSON et al., 2001).

Attademo (2014) testou a sensibilidade à oito antibióticos em 632 isolados de bactérias obtidos a partir das cavidades naturais de 30 peixes-bois-marinho mantidos em cativeiro no Brasil. Foi observada uma elevada frequência de *E. coli*, *Enterobacter* sp. e *Pseudomonas* sp., com resistência a pelo menos um antibiótico em 67,4% de todos os isolados. Os antibióticos que apresentaram maiores níveis de resistência foram penicilina, eritromicina, amoxicilina, ampicilina e gentamicina. A mesma autora detectou 97,1% de resistência a todos os antibióticos testados em *Staphylococcus* sp. e *E. coli* isoladas de abscessos destes animais.

Schaeffer et al. (2009) obtiveram 909 isolados de bactérias de duas populações de vida livre de golfinho-nariz-de-garrafa nos Estados Unidos, com elevada frequência de *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia* e *Pseudomonas fluorescens*, além do isolamento de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em três animais. A resistência a eritromicina, clindamicina, ampicilina, cefalotina, piperacilina e amoxicilina-clavulanato foram detectados, com padrões similares nas duas regiões pesquisadas.

Rose et al. (2009) avaliaram o perfil de sensibilidade à 16 antibióticos de 174 isolados de bactérias de 64 mamíferos marinhos encalhados e capturados em aparelhos de pesca nos Estados Unidos. Dentre as espécies prevalentes destacam-se *Aeromonas* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. e *Vibrio* spp. A resistência a pelo menos um antibiótico foi verificada em mais de 50% dos isolados, principalmente à cefalotina, ampicilina, carbenicilina e amoxicilina-clavulanato, respectivamente. A resistência a mais de oito antibióticos foi observada em *Chryseobacterium indologenes*, *Sphingomonas multivorium*, *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas* sp., *Providencia rettgeri*, isoladas de golfinhos, baleias e focas.

Assim como os antibacterianos, os antifúngicos são largamente utilizados de forma profilática e para o tratamento de infecções em cetáceos mantidos em cativeiro, predispondo a ocorrência de resistência (REIDARSON et al., 2001). Esses medicamentos são raramente utilizados de forma sistêmica na clínica de sirênios (BOSSART, 2001; D’AFFONSECA-NETO & VERGARA-PARENTE, 2007), com exceção de pomadas cicatrizantes com múltiplos compostos, incluindo antifúngicos, aplicadas comumente no tratamento de ferimentos e abscessos (*obs. pess.*).

Além do uso excessivo na rotina clínica, a resistência aos antifúngicos pode ter múltiplas origens. O uso de azólicos na agricultura tem papel relevante na transmissão de resistência na

medicina humana e veterinária, devido ao contato das leveduras da microbiota com resíduos presentes nos vegetais consumidos (MULLER et al., 2007). A utilização de alguns antibacterianos, como metronidazol, pode atuar na seleção de resistência em *Candida* sp. devido ao efeito antifúngico de baixo grau (ARENDRUP, 2013). Adicionalmente, já foi demonstrada a resistência de leveduras a diferentes tipos de solventes e derivados oléicos, mediada pela atividade das bombas de efluxo, que atuam sobre uma variedade de substratos, incluindo metais pesados e derivados químicos, o que pode acarretar em resistência cruzada aos derivados azólicos (KIEBOOM et al., 1998).

Dentre os poucos estudos realizados para detecção de resistência a antifúngicos em mamíferos aquáticos, destaca-se o de Takahashi et al. (2010), no qual foi avaliada a sensibilidade de 14 isolados de leveduras das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* do trato respiratório de golfinhos-nariz-de-garrafa mantidos em cativeiro. A resistência aos derivados azólicos itraconazol e fluconazol foi detectada em mais de 80% dos isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Naples et al. (2012), detectaram resistência ao voriconazol em cepa de *F. solani* isolada de lesão cutânea na nadadeira peitoral de uma beluga.

A virulência é verificada em muitas bactérias provenientes do ambiente marinho quando as alterações genéticas que levaram à aquisição de genes de virulência irão resultar em uma vantagem para a sua sobrevivência num determinado nicho. Dessa forma, cepas mais virulentas podem surgir e causar infecções em organismos marinhos (STEWART et al., 2008), incluindo os mamíferos. Hughes et al. (2013) investigaram a presença de *Vibrio* spp. em focas-do-porto (*Phoca vitulina*) de vida livre e encalhadas em área urbanizada do litoral da Califórnia. Uma maior prevalência foi observada nos animais de vida livre, com detecção de genes de virulência em *V. parahaemolyticus*, não constatados em *V. cholerae*. A morte de quatro filhotes infectados por cepas virulentas ocorreu durante o período de reabilitação.

Infecções experimentais com cepas de *Brucella* spp. isoladas de mamíferos marinhos foram realizadas para verificar a susceptibilidade de diferentes hospedeiros a esses microrganismos, porém estas se mostraram pouco virulentas quando comparadas a cepas de referência *B. abortus* e *B. melitensis* (NYMO et al., 2011). Não foram encontradas na literatura publicações sobre a produção de fatores de virulência por bactéria e fungos isolados de sirênios e cetáceos.

2.4 Tipagem molecular de *Candida albicans*

C. albicans é uma levedura comumente encontrada como comensal das mucosas de seres humanos e animais em todo o mundo. Essa espécie é o patógeno fúngico oportunista mais comum em humanos, podendo causar desde infecções superficiais a doenças disseminadas e fatais, principalmente em pessoas imunocomprometidas e pacientes doentes (BAI, 2014). Isolados de *C. albicans* já foram obtidos a partir de diversas espécies de mamíferos aquáticos (REIDARSON et al., 2001), no entanto a prevalência desse agente em animais de vida livre é menor do que aquela reportada para espécimes mantidos em cativeiro (BUCK et al., 2006; MORRIS et al., 2011).

Estudos epidemiológicos sobre o papel de tipos de cepas de *C. albicans* como comensais e patógenos em seus diversos hospedeiros evoluíram consideravelmente com o advento das técnicas moleculares. Anteriormente a tipagem de cepas era realizada por métodos fenotípicos, como morfotipagem, sorotipagem, biotipagem e testes de sensibilidade antifúngica, que tiveram seu uso para este fim limitado pela baixa reprodutibilidade entre laboratórios e/ou baixa capacidade discriminatória (MCMANUS & COLEMAN, 2014).

Métodos de tipagem molecular tem se mostrado muito úteis em análises epidemiológicas e de estrutura populacional de microrganismos patogênicos, facilitando a compreensão sobre a dinâmica de organismos infecciosos em populações humanas, as relações complexas entre comensais e patógenos, as origens das infecções, o surgimento de resistência aos antimicrobianos e a relação genética entre os isolados de uma mesma espécie (MCMANUS & COLEMAN, 2014).

Dentre os métodos moleculares para tipagem de *C. albicans* destacam-se o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism* - RFLP), a tipagem de polimorfismos de nucleotídeos únicos (*single nucleotide polymorphism array* - SNP array), *Southern blot*, polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*random amplification of polymorphic DNA* - RAPD), cariotipagem eletroforética, tipagem de microssatélites polimórficos e tipagem por sequenciamento de multilocus (MLST) (BOUGNOUX et al., 2002; ODDS, 2010).

Tecnologias baseadas no sequenciamento de DNA para tipagem de isolados de *C. albicans* tem substituído outros métodos. Através dessas técnicas pode-se mostrar de forma confiável as diferenças entre isolados de *C. albicans*, no entanto, dois isolados indistinguíveis não podem ser considerados idênticos ou clones, uma vez que apenas o sequenciamento do

genoma completo asseguraria a identidade dessas cepas. Os métodos de tipagem de cepas evidenciaram uma filogenia de *C. albicans* que envolve um modo clonal subjacente de reprodução com uma frequência elevada de eventos de recombinação, gerando diversidade genética e permitindo respostas rápidas às mudanças ambientais (ODDS, 2010).

A tipagem por sequenciamento de multilocus (MLST) de *C. albicans* envolve a amplificação por PCR e análise de sequências de 300-400 pares de base de sete *housekeeping genes* (AAT1, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13 e ZWF1), que são expressos constantemente e são estáveis diante das pressões de seleção. Para cada *locus*, variações nas sequências causadas por SNPs são identificadas como alelos diferentes. Cada alelo é assinalado como um número inteiro e a combinação do conjunto de sete alelos é definida como um tipo de sequência (ST), que recebe uma numeração única. A natureza diplóide de *C. albicans* aumenta os níveis de variação das sequências devido à presença de sítios com nucleotídeos heterozigotos, fornecendo genótipos adicionais. Em *C. albicans*, a ST também é referida como tipo de sequência diploide (DST) (BOUGNOUX et al., 2002).

A relação entre as cepas é avaliada através da elaboração de árvores filogenéticas, com base nas diferenças entre os perfis alélicos. O “agrupamento de pares não-ponderados baseado na média aritmética” (*unweight-pair group method with arithmetic mean* - UPGMA) é um método que tem sido usado na análise das distâncias genéticas de *C. albicans* pela metodologia do MLST. O UPGMA faz a análise das sequências a nível individual das diferenças dos SNPs e os clados de *C. albicans* podem ser representados numa árvore filogenética, agrupando-se tipos de cepas similares em “clusters” (DA MATTA, 2009; ODDS, 2010). A divisão de isolados de *C. albicans* em clados contendo tipos de cepas similares é um processo arbitrário, feito apenas para análise comparativa, uma vez que essa denominação é utilizada em análises filogenéticas para indicar grupos de organismos com ancestral comum (ODDS, 2010).

Atualmente existem 18 clados conhecidos para *C. albicans*, com características particulares e associações a determinadas regiões geográficas (MCMANUS & COLEMAN, 2014). Apesar da grande mobilidade dos seres humanos, o que facilita a homogeneização dos clados em todo o mundo, reservatórios locais podem manter uma possível associação entre cepas pertencentes a determinados clados e regiões geográficas (WROBEL et al., 2008).

Os dados de sequências obtidos são depositados no banco de dados mundial de MLST de *C. albicans* (www.calbicans.mlst.net), disponível na internet, permitindo a realização de análises epidemiológicas, filogenéticas e populacionais desta espécie de levedura. Apesar dos avanços nesse campo do conhecimento, isolados de muitas partes do mundo ainda não foram

avaliados, existindo muitas regiões subrepresentadas no banco de dados. A inclusão de um maior número de informações pode revelar a existência de clados adicionais e permitir uma avaliação mais precisa em nível mundial (MCMANUS & COLEMAN, 2014)

Poucos estudos de tipagem por MLST de *C. albicans* de origem animal foram realizados. Wrobel et al. (2008) e Jacobsen et al. (2008a) revelaram diferenças singnificativa na distribuição de clados entre cepas de animais e humanos que habitavam uma mesma região geográfica, sugerindo isolamento entre essas populações. Em culturas onde há maior associação entre seres humanos e animais, o compartilhamento de isolados geneticamente relacionados é mais frequente, havendo transmissão cruzada (ANGEBAULT et al., 2013). Apenas o trabalho de Jacobsen et al. (2008a) analisou isolados provenientes de mamíferos aquáticos, no qual três cepas de golfinhos (espécie não indicada) provenientes da Bélgica não apresentaram relação com isolados humanos.

3. HIPÓTESES

- 1- Há uma predominância de *Candida* não-*albicans* na microbiota de sirênios cativos e de cetáceos encalhados e de vida livre;
- 2- Leveduras do gênero *Candida* isoladas de sirênios e cetáceos são capazes de produzir fatores de virulência, como proteases, fosfolipases e biofilme, e há fenômeno de resistência *in vitro* aos derivados azólicos;
- 3- Doenças fúngicas são pouco prevalentes em sirênios mantidos em cativeiro e em cetáceos encalhados.
- 4- Leveduras da espécie *Candida albicans* isoladas de sirênios e cetáceos apresentam distintos perfis genotípicos de acordo com o hospedeiro e região geográfica de origem.

4. OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar fungos de sirênios e cetáceos no Brasil, visando investigar aspectos fenotípicos, genotípicos, diagnósticos e de virulência.

4.1 Objetivos específicos

- 1- Caracterizar a microbiota por leveduras cultiváveis das cavidades naturais de sirênios mantidos em cativeiro no Brasil;
- 2- Isolar e identificar leveduras das cavidades naturais de cetáceos encalhados no litoral do Ceará e de botos-vermelhos de vida livre, capturados no Rio Negro, Amazonas;
- 3- Estabelecer o perfil de sensibilidade antifúngica *in vitro* de leveduras do gênero *Candida* isoladas de sirênios e cetáceos;
- 4- Avaliar a produção de fatores de virulência (fosfolipases, proteases e biofilme) por leveduras do gênero *Candida* isoladas de sirênios e cetáceos;
- 5- Diagnosticar doenças fúngicas em sirênios mantidos em cativeiro e cetáceos encalhados no litoral do Ceará;
- 6- Realizar a tipagem molecular de cepas de *C. albicans* isoladas de sirênios.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos e licenças ambientais

Esse estudo foi submetido à avaliação pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, obtendo-se a licença SISBIO N° 35950-1, e pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual do Ceará (CEUA/UECE), sendo aprovado sob o número 12639479-2.

5.2. Animais

Foram colhidas amostras clínicas de 104 animais, incluindo 83 sirênios mantidos em cativeiro no Brasil, oito cetáceos encalhados vivos no litoral do Ceará e 13 botos-vermelhos de vida livre, capturados no Rio Negro, Amazonas, para o isolamento de leveduras e/ou diagnóstico de doenças fúngicas. A relação de espécies amostradas e caracterização dos espécimes de acordo com o sexo e classe de idade encontram-se descritas na tabela 1.

Os espécimes de peixe-boi-da-Amazônia eram mantidos no Centro de Preservação e Pesquisa de Mamíferos Aquáticos (CPPMA), localizado em Presidente Figueiredo/AM, enquanto os peixes-boi-marinho encontravam-se no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação Mamíferos Aquáticos (CMA/ICMBio), situado na Ilha de Itamaracá/PE, e na Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (AQUASIS), sediada em Caucaia/CE. Os cetáceos encalhados no litoral do Ceará foram resgatados pela equipe da AQUASIS entre os anos de 2012 e 2013. Os boto-vermelhos foram capturados no Rio Negro em fevereiro de 2015, em área localizada na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Rio Negro, município de Iranduba/AM, pelas equipes da Associação Amigos do Peixe-boi (AMPA) e do Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LMA/INPA).

Tabela 1. Caracterização dos espécimes coletados de acordo com a classificação taxonômica, sexo e classe de idade.

Espécie	Nome popular	n	Sexo*		Classe de idade**			
			M	F	N	Fi	J	A
Ordem Sirenia								
Família Trichechidae								
<i>Trichechus inunguis</i>	Peixe-boi-da-Amazônia	50	24	26	0	6	15	29
<i>Trichechus manatus</i>	Peixe-boi-marinho	33	16	17	5	9	11	8
Ordem Cetartiodactyla								
Infraordem Mysticeti								
Família Balaenopteridae								
<i>Megaptera novaeangliae</i>	Baleia-jubarte	1	1	0	0	0	1	0
Infraordem Odontoceti								
Família Physeteridae								
<i>Physeter macrocephalus</i>	Cachalote	1	1	0	1	0	0	0
Família Kogiidae								
<i>Kogia sima</i>	Cachalote-anão	3	2	1	0	1	0	2
<i>Kogia breviceps</i>	Cachalote-pigmeu	1	1	0	0	1	0	0
Família Delphinidae								
<i>Peponocephala electra</i>	Golfinho-cabeça-de-melão	2	2	0	0	1	0	1
Família Iniidae								
<i>Inia geoffrensis</i>	Boto-vermelho	13	13	0	0	0	6	7
TOTAL		104	60	44	6	18	33	47

*M (macho), F (fêmea)

** N (neonato), Fi (Filhote), J (juvenil) e A (adulto)

Os sirênios avaliados recebiam alimentação diversa, de acordo com a faixa etária e protocolos institucionais internos. Em geral, animais com até dois anos de idade recebem sucedâneos do leite materno e suplementação nutricional com vegetais cultivados (alface, couve, cenoura, beterraba, banana, etc.). Após o desmame a dieta é constituída por vegetais cultivados (alface, couve, acelga, repolho, vagem, cenoura, beterraba, pepino, etc.), gramíneas (capim colônia, etc.) e, no caso de peixes-boi-da-Amazônia, de plantas aquáticas encontradas na natureza (*Pistia stratiotes*), cultivadas em ambiente artificial. As condições de manutenção

em cativeiro também variaram. Peixes-bois-da-Amazônia eram mantidos em tanques com água doce, não clorada, com densidade variando de um a 16 animais por recinto, enquanto os peixes-bois-marinho encontravam-se em recintos de água salgada, clorada, com densidade variando de um a seis animais por tanque. Todos os espécimes receberam um escore clínico (ótimo, bom, regular e ruim) considerando a condição corporal, presença de lesões externas, histórico clínico e de uso de antimicrobianos.

Com relação aos oito cetáceos encalhados, não foi possível obter informações sobre a dieta, idade precisa, condições do ambiente e histórico clínico, visto que se tratava de animais selvagens, que possuem uma ampla área de vida. Apenas um espécime de cachalote foi solto na natureza após um breve período de quarentena, enquanto os demais animais vieram à óbito durante a reabilitação devido a lesões severas pretéritas ou agravadas nas circunstâncias do encalhe, diagnosticadas em exames necroscópicos.

Os botos-vermelhos foram capturados para estudos populacionais e para avaliação sanitária. Em geral, os animais estavam em boa condição corporal, com alguns apresentando lesões de pele superficiais e marcas de mordidas provocadas por conespecíficos. Os golfinhos, residentes durante grande parte do ano na reserva, eram utilizados para o ecoturismo e realização de bototerapia, atividades estas que os colocavam em contato direto com turistas de diversas partes do mundo e pacientes em tratamento. O toque nos animais era permitido, havendo ainda o fornecimento constante de peixes para atraí-los. Foram relatadas mordidas acidentais provocadas pelos botos durante as tentativas de apreender o alimento.

5.3 Coleta de amostras

Para o isolamento de leveduras foram inseridos *swabs* de algodão estéreis nas cavidades naturais (mucosa oral, narinas/espíráculo, abertura genital e reto) dos animais, rotacionados e posteriormente colocados em tubos contendo solução salina estéril até o processamento, que ocorreu de 4 a 24 horas após a colheita. No caso de animais de grande porte, como baleias e peixes-bois adultos, foram colhidas apenas as amostras da cavidade oral e trato respiratório devido as dificuldades na contenção física e manipulação.

5.4 Processamento microbiológico

5.4.1 Identificação fenotípica de leveduras

Os *swabs* coletados foram semeados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose 2%, acrescido de cloranfenicol (0,5 g/L). Em seguida, as placas foram incubadas a 25 °C durante um período de até cinco dias. As colônias sugestivas de leveduras foram coradas com lactofenol azul de algodão e observadas ao microscópio óptico (40X) para verificar a presença de blastoconídios, hifas ou pseudohifas, assim como para descartar a possibilidade de contaminação bacteriana. Posteriormente, as leveduras foram submetidas a testes morfológicos e bioquímicos para identificação em nível taxonômico mais específico possível (BRILHANTE et al., 2010; BRILHANTE et al., 2011).

A identificação das espécies de *Candida* foi realizada com base nas características fenotípicas, como a descrição da macromorfologia, mediante observação das colônias, e da micromorfologia, obtida a partir da realização de microcultivo em meio Ágar-fubá Tween 80. Paralelamente, foram realizados testes bioquímicos, como produção de urease, assimilação e fermentação de carboidratos e assimilação de nitrogênio. Todos os isolados de *Candida* foram semeados em meio cromogênico ChromAgar *Candida* (Difco, EUA) para identificação de colônias mistas (DE HOOG et al., 2000; SIDRIM & ROCHA, 2004; BRILHANTE et al., 2010).

Com relação aos outros gêneros de leveduras, os isolados *Trichosporon* sp. e *Rhodotorula* sp. foram inicialmente identificados por meio das características macroscópicas e microscópicas das colônias. Os microrganismos foram cultivados em ágar batata dextrose e em ágar uréia de Christensen e, 24 a 48h depois, foram montados microcultivos em lâmina, com ágar extrato de malte a 2%, para avaliação micromorfológica. Adicionalmente foram realizadas provas de assimilação de carboidratos e de nitrogênio para cada isolado. Quanto ao gênero *Cryptococcus* sp., as colônias foram cultivadas em ágar fubá Tween-80 e em ágar uréia de Christensen para análise morfológica e avaliação bioquímica, incluindo testes de assimilação de carboidratos e de nitrogênio (DE HOOG et al., 2000; SIDRIM & ROCHA, 2004; BRILHANTE et al., 2010). Quando a identificação morfológica e bioquímica não se mostrou conclusiva, as cepas foram analisadas pelo sistema automatizado VITEK 2®

5.4.2 Identificação molecular de leveduras do Complexo *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* e gênero *Trichosporon*

Os isolados pertencentes ao complexo *Candida parapsilosis* foram identificados molecularmente em nível de espécie. Para a extração de DNA, as colônias foram semeadas placas de Petri contendo ágar YEPD, incubadas por 24 horas a 35 °C. Após esse período, uma única colônia foi transferida para um microtubo contendo água destilada estéril para obtenção de um inóculo com turvação correspondente a 4 da escala de McFarland. Em seguida foi utilizado o kit comercial *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. A identificação molecular foi realizada com base na amplificação da sequência parcial do gene da enzima álcool desidrogenase secundária (*SADH*), de acordo com Tavanti et al. (2005) com modificações. A reação de PCR foi realizada em volume de 25µL com os oligonucleotídeos iniciadores S1F (5'-GTTGATGCTGTTGGATTGT-3') e S1R (5'-CAATGCCAAATCTCCCAA-3'). Foram utilizadas as seguintes condições de amplificação: 94°C por 7 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 74°C por 1 minuto, seguido de extensão final a 74°C por 10 minutos. Após a realização do PCR, os amplicons obtidos foram digeridos por até 24 horas com a enzima *BanI* (New England Biolabs) em reação contendo 20 µL do amplicon, 40 µL do tampão da enzima (10X) e 2 µL de solução com 20U/ µL de *BanI*. Os produtos de digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizadas com o auxílio de um transluminador. Os resultados obtidos foram comparados com os padrões de digestão das cepas controle *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. orthopsilosis* ATCC 96139 e *C. metapsilosis* ATCC 96143.

As cepas pertencentes à espécie *C. albicans* foram submetidas a identificação molecular por PCR para diagnóstico diferencial com *C. dubliniensis*, visto que essas duas espécies são indistinguíveis fenotipicamente. Para identificação de *Candida albicans* foram utilizados os primers CALF (5' - TGGTAAGGCGGGATCGCTT - 3') e CALR (5'-GGTCAAAGTTTGAAGATATAC). A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 2 µL de cada primer (50 pmol/µL), 5 µL de dNTP mix (Promega™) a 1mM, 0,25 U GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega™), 5 µL 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega™), 5µL de MgCl₂ (Promega™), 3,95 µL de água ultrapura e 2 µL de DNA-molde. As condições de ciclagem incluíam desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 30s e 72°C por 1 min, com extensão final por 10 min a 72°C.

Após a reação os amplicons gerados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%. A obtenção de bandas com peso molecular de 100 pb foi compatível com *C. albicans* (AHMAD et al., 2012).

Isolados de *Trichosporon* sp., cuja identificação fenotípica não foi conclusiva, foram sequenciados para confirmação da espécie. As colônias foram cultivadas em tubos contendo caldo YEPD, incubados por 24h a 35°C. Para a extração de DNA foi utilizado o kit comercial MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre® Biotechnologies), de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante. Em seguida foram realizadas PCRs das regiões do espaço intergênico (IGS1), do espaço interno transcrito (ITS1) e região variável D1/D2, utilizando os pares de primers 26SF (5'-ATCCTTTGCAGACGACTTGA-3') e 5SR (5'-AGCTTGACTTCGCAGATCGG-3'); ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'); e F63 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e LR3 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), respectivamente. Os amplicons foram submetidos a reações de sequenciamento pelo método da terminação da cadeia pelo didesoxinucleotídeo, utilizando 4µL do kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems), 1 µL de cada primer (26SF e 5SR, ITS1, e ITS4, F63 e LR3), e 3µL do produto de PCR, num volume final de 10 µL. As sequências foram analisadas em sequenciador ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems), montadas e editadas utilizando o software SeqScape® (Applied Biosystems) e comparadas com sequências de referência de *Trichosporon* sp. depositadas no GenBank, por meio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/GenBank/>) (FELL et al., 2000; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2005).

5.5 Testes de sensibilidade antifúngica *in vitro*

Os isolados de *Candida* spp. foram submetidos aos testes de avaliação de sensibilidade aos antifúngicos, realizados por microdiluição convencional, conforme preconizado pelo documento M27-A3 S4 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Foi obtido um inóculo a partir de cultura recente, ajustado para concentração de 0,5 a 2,5 x 10³ unidades formadoras de colônias (ufc)/mL de acordo com a escala de McFarland. As cepas foram incubadas em meio RPMI 1640, testadas em concentrações variando de 0,03125 a 16 µg/mL para anfotericina B (AMB) e itraconazol (ITC) e de 0,125 a 64 µg/mL para fluconazol (FLC). A leitura foi realizada após a incubação das placas de microdiluição a 35 °C por 48

horas, com base na redução de turbidez em relação ao poço de controle positivo. A concentração inibitória mínima (CIM) para AMB foi a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento fúngico, enquanto para FLC e ITC foi a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico. Em geral, a resistência de *Candida* spp. a AMB, FLC e ITC foi verificada quando se obteve CIMs >1 , ≥ 64 e ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Nas espécies *C. albicans*, Complexo *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, uma menor CIM de fluconazol, ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$, indica resistência *in vitro* a essa droga (Pfaller, 2012). Como controle de qualidade para cada teste foi incluída a cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019 (CLSI, 2012).

5.6 Produção de fatores de virulência

5.6.1 Fosfolipases

Os isolados de *Candida* spp. foram testados quanto a produção de fosfolipases. Inicialmente as cepas foram cultivadas em tubos contendo ágar batata dextrose, incubadas a 35°C por 48h. Em seguida foram preparados inóculos com turvação correspondente a 4 da escala de McFarland. Discos de papel com 5 mm de diâmetro foram impregnados com 5 μL do inóculo e em seguida colocados sobre a superfície de placas de Petri contendo o meio ágar gema de ovo, composto por ágar Sabouraud Dextrose 2%, acrescido de 1 mol/L de cloreto de sódio, 0,05 mol/L de cloreto de cálcio e 8% de emulsão de gema de ovo estéril a 30%. As placas de Petri foram incubadas a 35°C durante sete dias. A atividade de fosfolipase (Pz) foi determinada como a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro total (colônia + zona de precipitação), sendo considerados positivos os isolados que apresentaram $Pz < 1$. Foram atribuídos escores de intensidade de produção de fosfolipases conforme o valor de Pz. As cepas foram classificadas como não produtoras de fosfolipase quando $Pz = 1$; como apresentadoras de atividade enzimática quando $1 > Pz \geq 0,64$, e como fortes produtoras de fosfolipases quando $Pz < 0,64$ (SIDRIM et al., 2010; BRILHANTE et al., 2011).

5.6.2 *Proteases*

Os isolados de *Candida* spp. foram testados quanto a sua atividade proteolítica. Inicialmente as cepas foram cultivadas em tubos contendo caldo YEPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose), incubadas a 35°C por 24h. Em seguida foram preparados inóculos com turvação correspondente a 5 da escala de McFarland. Discos de papel com 5 mm de diâmetro foram impregnados com 10 µL do inóculo e em seguida colocados sobre a superfície de placas de Petri contendo o meio Agar albumina sérica bovina (2% dextrose, 0,1% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 0,25% K₂HPO₄, 0,02% MgSO₄ 7H₂O e 1,5% ágar, adicionados de uma solução de albumina sérica bovina (0,25%), após o resfriamento a 50 °C). As placas foram incubadas a 37° por 5 dias. A atividade proteolítica (Pz) foi determinada obtendo-se a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo da zona de precipitação. Quando Pz = 1, nenhuma atividade proteolítica foi detectada na cepa. Pz < 1 indicou produção enzimática. Quanto menor o valor de Pz, maior a atividade proteolítica (VIDOTTO et al., 2004).

5.6.3 *Biofilme*

Os isolados de *Candida* spp. testados para a sensibilidade antifúngica e atividades enzimáticas (fosfolipase e protease) foram analisados quanto a capacidade de formação de biofilme, de acordo com Ravi et al. (2009) e Peeters et al. (2008), com modificações. Inicialmente os isolados foram cultivados em ágar Sabouraud por 48h a 30°C. Posteriormente foram transferidos para caldo Sabouraud e incubados sob agitação (150rpm) por 24h. Em seguida os tubos foram centrifugados (3000rpm, 10 minutos), o sobrenadante foi descartado, foi realizada uma lavagem do pellet com PBS estéril, seguido por nova centrifugação, totalizando duas lavagens. O sobrenadante foi novamente retirado e o pellet foi ressuscitado em meio RPMI, obtendo-se um inóculo com turvação entre 0,5 e 1 na escala de McFarland. Os inóculos foram incubados em microplaca de poliestireno de 96 poços de fundo chato, em volume de 100µL, em triplicata, mantida sob agitação (150rpm) a 37°C. Foram utilizados poços para controle positivo e negativo de crescimento. Após a incubação, o sobrenadante dos poços foi aspirado cuidadosamente e realizadas três lavagens com PBS-Tween. Em seguida, os poços foram lavados com 100µl de metanol 100%. Após a secagem foi adicionado 100µl de solução 0,3% de cristal violeta durante 20 minutos. Após esse tempo, o cristal violeta foi removido e foi feita uma lavagem com 200µl de água destilada estéril por duas vezes. Foi adicionado aos

poços já corados 150µl de solução de ácido acético 33% durante 30 segundos. As placas foram imediatamente lidas por espectrofotometria e os resultados da densidade óptica foram analisados com comprimento de onda de 540 nm (DO540 nm). Os dados de densidade óptica obtidos foram corrigidos, comparando-os ao controle negativo. O ponto de corte (DOc) para o ensaio foi definido como sendo três desvios-padrão acima da média DO540 nm do controle negativo. Ao final, todas as cepa testadas foram classificadas de acordo com Stepanovic et al. (2000), com modificações, como não produtoras de biofilme ($DO540 \text{ nm} \leq DOc$), produtoras fracas ($DOc < DO540 \text{ nm} \leq 2 \times DOc$), produtoras moderadas ($2 \times DOc < DO540 \text{ nm} \leq 4 \times DOc$) e produtoras fortes ($4 \times DOc < DO540 \text{ nm}$).

5.7 Diagnóstico de doenças fúngicas

Caso clínico 1

Em fevereiro de 2013, um filhote de peixe-boi-da-Amazônia do sexo masculino, com idade estimada de seis meses, mantido em reabilitação no CPPMA, apresentou placas sobressalentes na pele, de coloração acinzentada, consistência rugosa, contornos irregulares e de distribuição difusa (Figura 1). Foram observados sinais clínicos de prurido, com o animal apresentando comportamento de friccionar o corpo nas paredes do recinto, e relatado um lento desenvolvimento corporal. O animal recebia banhos diários com solução de clorexidine a 2% e não foi tratado anteriormente com uso de medicamentos sistêmicos. O recinto era abastecido com água doce filtrada, sem cloração, em área abrigada e completamente sombreada. Diariamente ocorria o esvaziamento e limpeza das paredes e piso, com completa substituição da água. O tanque era compartilhado com outro filhote de menor porte, que não apresentava alterações na pele. Foi realizado um raspado de pele na borda de uma lesão na região torácica. As escamas de pele foram acondicionadas em frasco estéril, encaminhadas para processamento microbiológico imediato. As amostras foram semeadas em tubos contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e ágar Mycosel, incubadas a temperatura ambiente por até cinco dias para observação do crescimento de colônias fúngicas. Após o crescimento foi realizado o microcultivo por sete dias em ágar batata para observação da micromorfologia e posterior identificação (DE HOOG et al., 2000).

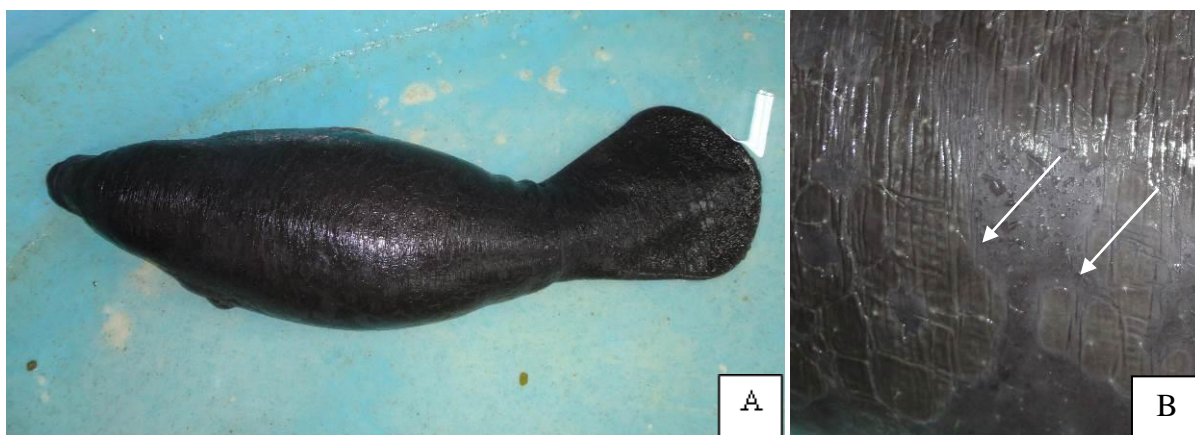


Figura 1. Filhote de peixe-boi-da-Amazônia com pele de aspecto rugoso, com placas sobressalente e irregulares disseminadas por todo o corpo (A). Detalhe das lesões (B) (setas).

Caso clínico 2

Em setembro de 2013, um filhote de peixe-boi-marinho do sexo feminino, de dois meses de idade, mantido em reabilitação no CRMM/AQUASIS, apresentou lesões de pele superficiais, de coloração escura, contornos irregulares, medindo cerca de 0,5 cm, de distribuição multifocal. O animal encontrava-se no início da fase de muda natural da pele. Foram realizados banhos semanais com solução de clorexidina a 2%, porém as lesões se expandiram e se disseminaram por todo o corpo do animal ao longo de 30 dias. Inicialmente apresentaram coloração acinzentada ou avermelhada, porém, após sete a 10 dias, se tornaram enegrecidas e ultrapassaram 3 cm em seu maior diâmetro (Figura 2). Não foram observados sinais clínicos de prurido e inapetência. Foi realizado o exame clínico, biometria e coleta de sangue para hemograma completo e análises bioquímicas séricas semanalmente. O filhote era mantido em piscina abastecida com água salgada, pré-clorada e filtrada, sem contato com outros espécimes de peixe-boi.

No dia 15 de outubro de 2013 foi realizado um raspado das lesões de pele para análise microbiológica. Foi realizado um exame direto em hidróxido de potássio a 10%, sendo constatada a presença de hifas demáceas, septadas e toluróides (Figura 3). Os fragmentos de pele foram semeados em tubos contendo ágar Sabouraud, ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e ágar Mycosel. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por até cinco dias para observação do crescimento de colônias fúngicas. Após o crescimento, foi

realizado o microcultivo por sete dias em ágar batata para observação da micromorfologia e posterior identificação (DE HOOG et al., 2000).



Figura 2. Filhote de peixe-boi marinho (08S0112/17) apresentando lesões escuras e irregulares no dorso (setas).

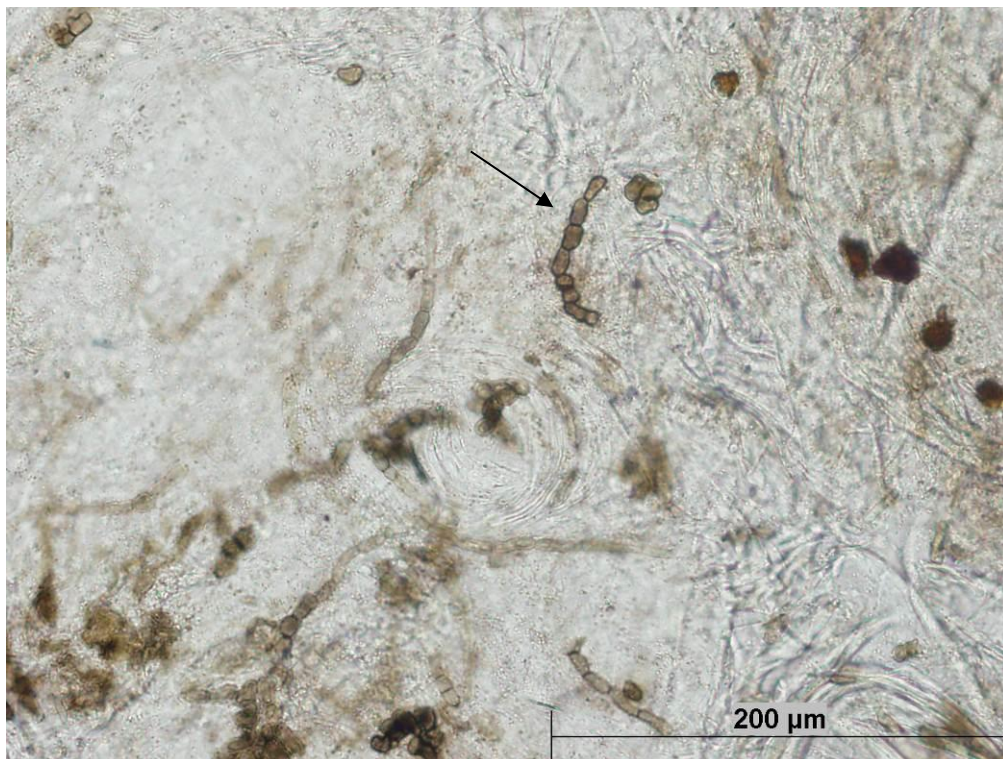


Figura 3. Hifas demáceas, torulóides e septadas em exame direto de lesão cutânea de peixe-boi-marinho 08S0112/17 (seta). (aumento 400x).

Caso clínico 3

No período de março de 2014 a março de 2015 foram observadas lesões sugestivas de dermatite fúngica em oito filhotes de peixe-boi-marinho mantidos em reabilitação no CRMM/AQUASIS (Figuras 4 e 5). Os animais, de idades, sexos e estado de saúde distintos, apresentaram quadros clínicos similares, caracterizados por lesões de contorno irregular, coloração rosada, de distribuição, evolução e data de observação variáveis (Quadro 1). Nenhum dos espécimes apresentou sinais clínicos de prurido. Foram realizados exames clínicos, biometrias e coletas de sangue para hemograma completo e análises bioquímicas séricas em frequência variável, de acordo com a idade (semanal – de um a três meses; quinzenal – de quatro a seis meses; mensal – de seis meses a um ano). Os filhotes eram mantidos em piscinas abastecidas com água salgada, clorada, filtrada, isolados, em pares ou trios. A distribuição dos animais nos recintos variou de acordo com o desenvolvimento corporal, estado de saúde e questões logísticas.

Foram realizados raspados das lesões de pele dos oito filhotes ao longo desse período para análise microbiológica. O exame direto em hidróxido de potássio a 10% foi realizado com amostras de todos os animais, sendo constatada a presença de hifas hialinas e septadas. Os fragmentos de pele foram semeados em tubos contendo ágar Sabouraud, ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e Ágar Mycosel. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por até cinco dias para observação do crescimento de colônias fúngicas. Após o crescimento, foi realizado o microcultivo por sete dias em ágar batata para observação da micromorfologia e posterior identificação (DE HOOG et al., 2000).

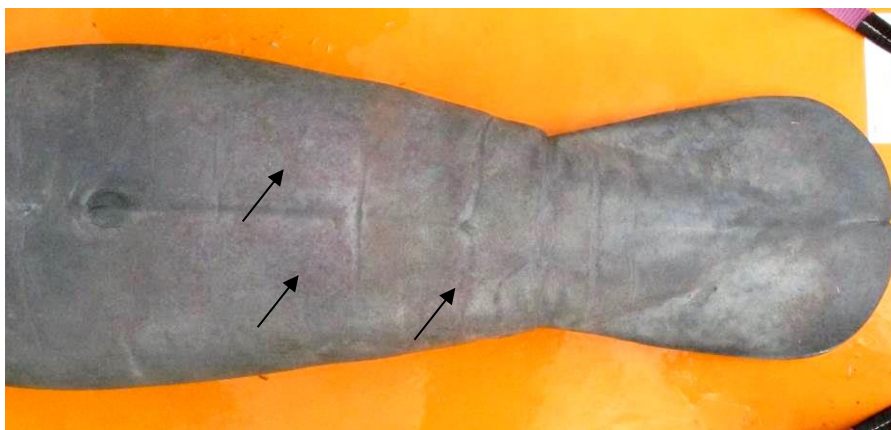


Figura 4. Filhote de peixe-boi-marinho (02S0111/63) apresentando lesões de coloração rosada, difusas, na região ventral do corpo (setas).

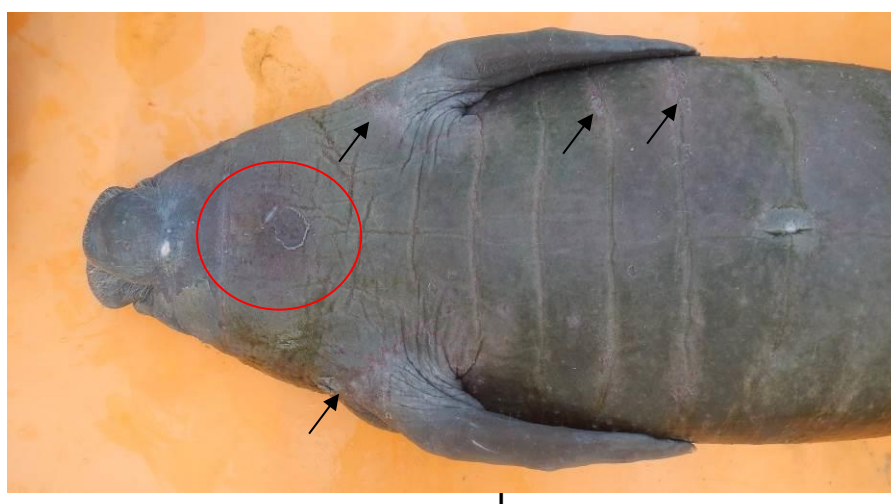


Figura 5. Filhote de peixe-boi-marinho (08S0112/19) apresentando lesões de coloração rosada, difusas, na região ventral da cabeça (círculo), regiões axilares e dobras do corpo (setas).

Quadro 1. Dados biológicos, clínicos e de manejo de peixes-bois-marinhos com quadro suspeito de dermatite fúngica.

Registro	Idade	Sexo	Data da observação	Sinais clínicos/ Situação no recinto	Data do raspado
02S0111/63	4 meses	M	25/03/14	Lesões rosadas, puntiformes, na região abdominal ventral e nadadeira caudal. Após trinta dias se disseminaram, tornando-se coalescentes/ Isolado no recinto.	02/04/14
08S0112/17	11 meses	F	28/07/14	Lesões rosadas em torno do umbigo e região axilar/ Isolada no recinto.	29/07/14
02S0111/65	3 meses	M	27/01/15	Lesões rosadas puntiformes na nadadeira peitoral e região axilar/ Recinto compartilhado com 02S0111/66.	10/02/15
02S0111/66	3 meses	M	27/01/15	Lesões rosadas puntiformes na nadadeira peitoral e região axilar/ Recinto compartilhado com 02S0111/65.	10/02/15
08S0112/19	1 mês	F	10/02/15	Lesões rosadas na região axilar, que se disseminaram para o restante do corpo em 10 dias, atingindo as narinas, áreas de muda natural da pele e camadas subjacentes/	10/02/15

				Recinto compartilhado com 02S0111/68 de 06/03 a 24/03/15. Filhote 02S0111/71 colocado no mesmo tanque em 26/03/15.	
02S0111/68	2 meses	M	27/02/15	Lesões rosadas na região axilar esquerda / Mantido isolado em recinto, ocupado anteriormente (até 21/02) por 02S0111/65 e 02S0111/66. Expansão das lesões para nadadeiras peitorais após 7 dias/ Filhote 08S0112/19 transferido para o mesmo recinto em 06/03/15.	03/03/15
02S0112/70	1 mês	F	17/03/15	Lesões rosadas nas nadadeiras peitorais e axilas/ Isolada no recinto	24/03/15
02S0111/71	20 dias	M	24/03/15	Lesões no ventre e nadadeiras peitorais / Isolado no recinto até 26/03/15, quando foi transferido para recinto com 08S0112/19.	24/03/15

5.8 Tipagem de cepas de *Candida albicans* por sequenciamento de multilocus (MLST)

As cepas de *C. albicans* isoladas a partir de sirênios foram submetidas à tipagem molecular por sequenciamento de multilocus de acordo com Bougnoux et al. (2003). Inicialmente as colônias foram semeadas em tubos contendo caldo YEPD, incubados por 24 horas a 37 °C, sob agitação. Um volume de 1,5 ml da cultura em caldo foi utilizado para a extração de DNA, empregando-se o kit comercial MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre® Biotechnologies), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para avaliação da extração de DNA foram realizadas reações de eletroforese em gel de agarose a 1%.

Reações de PCR foram realizadas para sete genes, sendo estes AAT1 (Asparato aminotransferase), ACC1 (Acetil coenzima A carboxilase), ADP1 (Permease ATP-dependente), MPIb (Manose fosfato isomerase), SYA1 (Alanil-RNA sintetase), VPS13 (Proteína vacuolar) e ZWF1 (Glicose-6-fosfato desidrogenase), utilizando-se separadamente sete pares de primers distintos, AAT1 (Fwd 5'-ACTCAAGCTAGATTTTTGGC-3', Rev 5'-CAGCAACATGATTAGCCC-3'), ACC1 (Fwd 5'-GCAAGAGAAATTTAATTCAATG-3', Rev 5'-TTCATCAACATCATCCAAGTG-3), ADP1 (Fwd 5'-GAGCCAAGTATGAATGATTTG-3', Rev 5'-TTGATCAACAAACCCGATAAT-3), MPIb

(Fwd 5'-ACCAGAAATGGCCATTGC-3', Rev 5'-GCAGCCATGCATTCAATTAT-3'), SYA1 (Fwd 5'-AGAAGAATTGTTGCTGTTACTG-3', Rev 5'-GTTACCTTTACCACCAGCTTT-3'), VPS13 (Fwd 5'-TCGTTGAGAGATAATCGACTT-3', Rev 5'-ACGGATGGATCTCCAGTCC-3') e ZWF1 (Fwd 5'-GTTTCATTTGATCCTGAAGC-3', Rev 5'-GCCATTGATAAGTACCTGGAT-3'), respectivamente.

As reações de PCR foram conduzidas em volume final de 50 µL, contendo 5 µL de Tampão 10X (Invitrogen), 1 µL de dNTP [5Mm], 3 µL de MgCl₂ [5Mm], 1 µL de primer “forward” [100µM] (Proligo), 1 µL de primer “reverse” [100µM] (Proligo), 0,2 µL de Taq polimerase [5U/µL] (Invitrogen), 37,8 µL de água Milli-Q e 1 µL de DNA. Foram utilizadas as seguintes condições de amplificação: 94°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os amplicons foram submetidos a reações de sequenciamento pelo método da terminação da cadeia pelo didesoxinucleotídeo, utilizando 4µL do kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), 1 µL de cada primer (forward e reverse), e 3µL do produto de PCR, num volume final de 10 µL. As sequências foram analisadas em sequenciador ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems), montadas e editadas utilizando o software SeqScape® (Applied Biosystems).

As sequências obtidas para cada gene de cada cepa foram disponibilizadas na forma de cromatogramas e visualizadas criteriosamente para identificação de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em sítios previamente conhecidos. A presença de dois picos de tamanho similar, na mesma posição, indicou a existência de heterozigose, sendo substituídos pelas letras K (G+T), M (A+C), S (G+C), R (A+G), Y (C+T) e W (A+T), de acordo com o sistema de código internacional IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Cada sequência foi inserida individualmente no site do MLST para *C. albicans* (<http://calbicans.mlst.net>), comparada com banco de dados e obtido o número do alelo correspondente. A tipagem de cada cepa foi realizada através da combinação dos números de genótipos obtidos para cada um dos sete genes avaliados. As descobertas de novos alelos e novas sequências foram avaliadas e cadastradas pela responsável pelo site.

A análise filogenética foi realizada por “*unweighted pair group method with arithmetic averages* (UPGMA)” e “neighbor-joining algoritmos” através do programa MEGA 4.

Posteriormente os clados foram numerados de acordo com a utilização em publicações sobre distribuição populacional de cepas de *C. albicans* (ODDS et al., 2007; DA MATTA, 2009).

5.9 Análise estatística

A taxa de positividade entre as duas espécies de sirênios e a recuperação dos diferentes gêneros de leveduras entre os diferentes hospedeiros foram comparadas através do teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%.

Para verificar as diferenças de CIMs das drogas antifúngicas testadas entre as diferentes variáveis, os valores CIM foram submetidos à transformação Log₂. Com base nesta transformação, os dados foram analisados por meio de modelos de regressão linear, utilizando os valores Log₂ da CIM como variável explicativa. Para as variáveis explicativas foram utilizados os valores de fosfolipases, proteases e biofilme, além dos dados categóricos referentes ao hospedeiro, classe de idade, sítio anatômico pesquisado e espécie de *Candida*, com o emprego de variáveis dummy. Foram também utilizados modelos de regressão para avaliar a diferença na produção de protease, fosfolipase e biofilme entre as diversas espécies de leveduras estudadas. Valores de P inferiores ou iguais a 5% indicaram conclusões estatisticamente significativas.

6. RESULTADOS

6.1 Identificação de leveduras

6.1.1 Sirênios

6.1.1.1 *Trichechus inunguis*

Foram isoladas 112 leveduras dos quatro sítios anatômicos avaliados de *T. inunguis*, sendo 82% (41/50) dos animais positivos. As taxas de isolamento foram de 68% (34/50) para a cavidade oral, 10% (5/10) para as narinas, 84,3% (27/32) para a abertura genital e 67,7% (21/31) para o reto.

Quatro gêneros de leveduras foram identificados (Tabela 2). *Candida* sp. representou 72,3% (81/112) dos isolados, seguida por *Trichosporon* sp. com 25% (28/112), *Rhodotorula* sp. com 1,78% (2/112) e *Cryptococcus* sp. com 0,89% (1/112). Doze espécies de *Candida* foram obtidas, sendo *Candida albicans* a espécie de levedura mais isolada (40/112). As espécies de *Candida* não-*albicans* obtidas foram *C. parapsilosis sensu stricto* (14/112), *C. orthopsilosis* (4/112), *C. metapsilosis* (3/112), *C. guilliermondii* (9/112), *C. pelliculosa* (3/112), *C. tropicalis* (2/112), *C. glabrata* (2/112), *C. famata* (1/112), *C. krusei* (1/112), *C. norvegensis* (1/112), *C. ciferri* (1/112). Foi obtido um isolado de *Cryptococcus laurentii*.

Dentre os 28 isolados do gênero *Trichosporon*, apenas seis puderam ser recuperados a partir do estoque em solução salina e foram identificados por meio de sequenciamento. Para as regiões ITS1, IGS1 e D1/D2 obteve-se de 96 a 100% de similaridade com as sequências de referência FJ943429, JX111988 e EU559350 depositadas no GenBank identificadas como *T. asahii*.

A partir de 20 amostras positivas de 16 *T. inunguis* obteve-se colonização mista num mesmo sítio anatômico. Duas espécies de leveduras foram isoladas de seis amostras orais, uma de narina, quatro de abertura genital e quatro de reto. Até três espécies diferentes de leveduras foram isoladas de cinco *swabs* retais. Dentre estes animais, três indivíduos apresentaram colonização mista em dois sítios anatômicos.

6.1.1.2 *Trichechus manatus*

Foram obtidas 29 leveduras dos quatro sítios anatômicos avaliados de *T. manatus*. Dentre os animais avaliados, 76,9% (20/26) foram positivos. As taxas de isolamento foram de 42,3% (11/26) para a cavidade oral, 19,2% (5/26) para as narinas, 50% (6/12) para o trato geniturinário e 45,4% (5/11) para o reto. Em geral, a taxa de recuperação de leveduras a partir de *T. manatus*, considerando todos os sítios anatômicos avaliados, foi menor do que a obtida para *T. inunguis* ($P < 0,05$).

Três gêneros de leveduras foram identificados (Tabela 2). *Candida* sp. representou 82,7% (24/29) dos isolados, seguido por *Rhodotorula* sp. com 13,8% (4/29) e *Trichosporon* sp. com 6,89% (1/29). As taxas de isolamento de *Rhodotorula* sp. e *Trichosporon* sp. a partir de *T. manatus*, foram maiores e menores, respectivamente, do que as obtidas para *T. inunguis* ($P < 0,05$). As espécies identificadas foram *C. albicans* (12/29), *C. tropicalis* (4/29), *C. famata* (4/29); *C. guilliermondii* (3/29), *C. krusei* (1/29), *Rhodotorula mucilaginosa* (2/29) e *Rhodotorula minuta* (1/29). O único isolado de *Trichosporon* sp. obtido não pôde ser caracterizado molecularmente devido as dificuldades em recuperá-lo a partir do estoque em solução salina.

A colonização mista foi verificada em apenas uma amostra de *T. manatus*, na qual três espécies distintas de *Candida* foram isoladas da cavidade oral de um mesmo indivíduo.

Tabela 2. Número e porcentagem de espécies de leveduras isoladas de *T. inunguis*, *T. manatus* de acordo com o sítio anatômico.

Espécie de levedura	<i>Trichechus inunguis</i>					<i>Trichechus manatus</i>				
	Cav. oral n (%)	Narina n (%)	Genitália n (%)	Reto n (%)	Total n (%)	Cav. Oral n (%)	Narina n (%)	Genitália n (%)	Reto n (%)	Total n (%)
<i>Candida albicans</i>	26 (65)	-	11 (35,6)	3 (8,6)	40 (35,7)	9 (69,2)	3 (60)	-	-	12 (41,8)
<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	3 (7,5)	2 (33,2)	4 (13)	5 (14,4)	14 (12,5)	-	-	-	-	-
<i>C. orthopsilosis</i>	1 (2,5)	-	1 (3,2)	2 (5,7)	4 (3,7)	-	-	-	-	-
<i>C. metapsilosis</i>	-	1 (16,7)	-	2 (5,7)	3 (2,6)	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	2 (5)	-	3 (9,6)	4 (11,5)	9 (8)	1 (7,7)	-	1 (16,7)	1 (20)	3(10,3)
<i>C. pelliculosa</i>	-	-	1 (3,2)	2 (5,7)	3 (2,6)	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	1 (3,2)	1 (2,8)	2 (1,8)	1 (7,7)	1 (20)	2 (33,3)	-	4 (13,7)
<i>C. glabrata</i>	-	1 (16,6)	-	1 (2,8)	2 (1,8)	-	-	-	-	-
<i>C. famata</i>	-	-	-	1 (2,8)	1 (0,9)	2 (15,4)	-	-	2 (40)	4 (13,7)
<i>C. ciferri</i>	-	1 (16,6)	-	-	1 (0,9)	-	-	-	-	-
<i>C. norvegensis</i>	-	-	1 (3,2)	-	1 (0,9)	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	-	-	1 (3,2)	-	1 (0,9)	-	-	-	1 (20)	1 (3,4)
<i>Trichosporon</i> sp.	5 (12,5)	-	5 (16,1)	12 (34,3)	22 (19,6)	-	1 (20)	-	-	1 (3,4)
<i>T. asahii</i>	3 (7,5)	1 (16,6)	2 (6,5)	-	6 (5,4)	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	-	-	-	2 (5,7)	2 (1,8)	-	-	-	1 (20)	1 (3,4)
<i>R. mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	2(33,3)	-	2 (6,9)
<i>R. minuta</i>	-	-	-	-	-	-	-	1(16,7)	-	1 (3,4)
<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	1 (3,2)	-	1 (0,9)	-	-	-	-	-
TOTAL	40	6	31	35	112	13	5	6	5	29

6.1.2 Cetáceos

Dentre os 21 cetáceos avaliados, foram obtidos 14 isolados de leveduras dos sítios anatômicos das espécies de hospedeiros *P. electra* (n=1), *K. sima* (n=3), *K. breviceps* (n=1) e *Inia geoffrensis* (n=4). Não foram isoladas leveduras a partir das amostras de *M. novaeangliae* e *P. macrocephalus*. Adicionalmente foi obtido um isolado da alga patogênica *Prothoteca* sp. a partir do reto de um espécime de *K. sima*. As taxas de isolamento foram de 9,5% (2/21) para a cavidade oral, 14,3% (3/21) para o espiráculo, 26,3% (5/19) para a abertura genital e 26,3% (5/19) para o reto (Tabela 3).

Tabela 3. Número e porcentagem de espécies de leveduras e alga isoladas de cetáceos de acordo com o sítio anatômico.

Espécie de levedura x Hospedeiro	Sítio anatômico				Total n (%)
	Cav. oral n (%)	Espiráculo n (%)	Genitália n (%)	Reto n (%)	
<i>Complexo C. parapsilosis</i>					2 (13,3)
<i>P. electra</i>	1 (50)	-	-	-	
<i>K. breviceps</i>	-	1 (33,3)	-	-	
<i>C. tropicalis</i>					6 (40)
<i>K. sima</i>	1 (50)	2 (66,7)	2 (40)	1 (20)	
<i>C. famata</i>					2 (13,3)
<i>K. sima</i>	-	-	-	1 (20)	
<i>I. geoffrensis</i>	-	-	-	1 (20)	
<i>Candida</i> sp.					1 (6,7)
<i>I. geoffrensis</i>	-	-	1 (20)	-	
<i>Cryptococcus</i> sp.					3 (20)
<i>I. geoffrensis</i>	-	-	2 (40)	1 (20)	
<i>Prothoteca</i> sp.					1 (6,7)
<i>K. sima</i>	-	-	-	1 (20)	
TOTAL	2	3	5	5	15

Dois isolados pertencentes ao Complexo *C. parapsilosis* não foram identificados molecularmente, pois não houve crescimento a partir do estoque em solução salina. Não foi observada colonização mista em nenhuma amostra.

6.2 Fatores fisiológicos e ambientais

6.2.1 Sirênios

Todos os sirênios avaliados receberam um escore clínico para determinação do estado de saúde. Apenas os animais classificados com escore ótimo e bom, de ambos os sexos e classes etárias, foram utilizados como referência para caracterização da microbiota. Com relação a *T. inunguis*, 88% (44/50) dos espécimes receberam escore ótimo, 8% (4/50) bom e 4% (2/50) médio. Contagens de UFC >50 só foram obtidas em animais com escore ótimo e bom. Considerando o fator idade, pelo menos uma espécie de levedura foi isolada de 100% (6/6) dos filhotes e juvenis (15/15) e de 69% (20/29) dos adultos. Quanto ao sexo, uma maior taxa de isolamento foi observada nos machos, sendo esta de 95,8% (23/24), do que nas fêmeas, de 69,2% (18/26) (P<0,05).

Na avaliação de *T. manatus*, 69,3% (18/26) dos animais receberam escore clínico ótimo, 11,5% (3/26) bom, 11,5% (3/26) médio e 7,7% (2/26) ruim. Assim como em *T. inunguis*, contagens de UFC >50 só foram obtidas em animais com escore ótimo e bom. Considerando o fator idade, pelo menos uma espécie de levedura foi isolada de 60% (3/5) dos neonatos, 100% (2/2) dos filhotes, 72,7% (8/11) dos juvenis e 87,5% (7/8) dos adultos. Quanto ao sexo, uma maior taxa de isolamento foi observada nos machos, sendo esta de 90,9% (10/11), do que nas fêmeas, de 66,6% (10/15) (P<0,05).

Tendo em vista que a maioria das espécies de leveduras isoladas de sirênios com escore médio ou ruim (*C. guilliermondii*, *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. famata*, *C. albicans* e *C. tropicalis*) também estavam presentes nos animais saudáveis, estas foram consideradas como constituintes da microbiota. Apenas um isolado de *C. krusei* (1/112) foi obtido de *T. inunguis*, sendo este proveniente da abertura genital de um filhote que havia sido submetido a um procedimento cirúrgico realizado na região perigenital no dia anterior a coleta. Com relação a *T. manatus*, 66,6% (2/3) dos animais em que houve isolamento do gênero *Rhodotorula* estavam imunocomprometidos. O espécime saudável cujo isolamento também foi positivo para esse gênero encontrava-se em recinto ao lado de animal de escore médio com *Rhodotorula* sp. em dois sítios anatômicos. Dessa forma, sugere-se que *C. krusei* e *Rhodotorula* sp. não sejam consideradas constituintes da microbiota normal de *T. inunguis* e *T. manatus*, respectivamente.

Considerando ambas as espécies de sirênios, não foram observadas diferenças nas taxas de isolamento com relação ao tipo de dieta, uma vez que animais que recebiam apenas sucedâneo ou sucedâneo e vegetais ou somente vegetais estavam colonizados por leveduras. Todos os peixes-boi-da-Amazônia avaliados eram mantidos em tanques com água doce, filtrada, porém sem tratamento químico, enquanto os peixes-boi-marinhos eram mantidos em recintos com água salgada, filtrada e clorada. Apesar do maior número de isolados ter sido obtido de *T. inunguis*, a prevalência de animais positivos foi equivalente para as duas espécies de hospedeiros, não sendo possível avaliar a influência da salinidade e cloração da água sobre a colonização por leveduras.

As taxas de isolamento foram aparentemente mais elevadas nos recintos com densidade superior a 10 peixes-bois (52,1%), quando comparadas a recintos que continham de dois a cinco espécimes (42,2%) e aqueles com apenas um indivíduo (38,4%). Na maioria dos recintos com mais de três animais foi observado que estes compartilham uma espécie ou gênero de leveduras predominante em alguns sítios anatômicos, considerando aqueles cujo isolamento foi positivo (Tabela 4)

Tabela 4. Espécies de leveduras predominantes nos sítios anatômicos de sirênios de um mesmo recinto

Recinto	Hosp.	(n) animais	Espécies de levedura predominante			
			Cav. Oral	Narina	Genital	Reto
A	<i>T. inunguis</i>	16	<i>C. albicans</i> 76,9% (10/13)*	<i>C. albicans</i> 66,6% (2/3)	<i>C. albicans</i> 61,5% (8/13)	<i>C. parapsilosis</i> <i>sensu stricto</i> 50% (5/10)
B	<i>T. inunguis</i>	16	<i>C. albicans</i> 100% (9/9)		<i>Trichosporon</i> sp. 44,4% (4/9)	<i>Trichosporon</i> sp. 77,7% (7/9)
C	<i>T. inunguis</i>	12	<i>C. albicans</i> 66,6% (4/6)			
D	<i>T. manatus</i>	5	<i>C. albicans</i> 100% (3/3)			
E	<i>T. manatus</i>	4	<i>C. albicans</i> 100% (4/4)			

*número de animais positivos para uma mesma espécie de levedura/ número de animais positivos para um mesmo sítio anatômico

6.2.2 Cetáceos

Com relação aos cetáceos, 33,3% (7/21) receberam escore clínico ruim, 19,1% (4/21) tiveram escore médio e 47,6% (10/21) estavam com escore bom. A maioria dos botos-vermelhos capturados receberam escore bom, visto que estavam em boa condição corporal e sem lesões externas, no entanto, três espécimes foram classificados com escore médio por apresentarem discreta emaciação e lesões cutâneas suspeitas de etiologia viral. Um espécime de *P. macrocephalus* recebeu escore médio e foi solto com sucesso no ambiente natural. Todos os demais cetáceos que encalharam no litoral do Ceará vieram à óbito.

Para todos os animais positivos foi obtida contagem de CFU<50. A maioria dos espécimes (20/21) era de machos, não sendo possível avaliar a influência do sexo sobre as taxas de isolamento. Considerando a classe etária, foram observados filhotes (3/4), juvenis (2/7) e adultos (4/10). Todos os isolados obtidos a partir de animais encalhados foram provenientes de animais doentes, portanto estas leveduras não podem ser consideradas como constituintes da microbiota normal. A baixa taxa de isolamento de leveduras a partir de *I. geoffrensis* de vida livre, incluindo um espécime com escore clínico médio, sugere que estes microrganismos são pouco representativos na microbiota.

6.3 Sensibilidade *in vitro* de leveduras aos antifúngicos

6.3.1 Sirênios

Os isolados de *Candida* spp. testados (n=105) apresentaram CIMs para Anfotericina B variando de 0,03 a 1µg/mL, não sendo observada resistência a essa droga. A CIM para Anfotericina B em *C. albicans* foi estatisticamente superior aquelas encontradas para as demais espécies (P <0,017)

Com relação aos derivados azólicos, as CIMs variaram de 0,03 a 16µg/mL para itraconazol e de 0,125 a 64µg/mL para fluconazol. Dentre as cepas avaliadas, 35,2% (37/105) apresentaram resistência a pelo menos um dos derivados azólicos, com prevalência similar entre os isolados de *T. inunguis* e *T. manatus*. Cepas resistentes foram obtidas de todos os sítios anatômicos avaliados.

Dentre as cepas resistentes, 86,5% (32/37) eram *C. albicans*, 10,8% (4/37) *C. tropicalis* e 2,7% (1/37) *C. guilliermondii*. Considerando estes isolados, 48,6% (18/37) apresentaram resistência aos dois azólicos, 40,5% (15/37) ao itraconazol e 10,8% (4/37) ao fluconazol. Altos índices de resistência foram detectados em *C. albicans* e *C. tropicalis*, sendo estes de 61,5% (32/52) e 66,7% (4/6), respectivamente. A CIM para itraconazol em *C. albicans* foi estatisticamente superior aquelas encontradas para as demais espécies (P <0,011). Os valores de CIM obtidos para todos os isolados de *Candida* spp. de ambos os hospedeiros encontram-se descritos na tabela 5.

Tabela 5. Perfil de sensibilidade aos antifúngicos de cepas de *Candida* spp. isoladas de sirênios.

Hospedeiro	Sítio	Espécie de levedura	CIM			Isolados resistentes	
			AMB	ITC	FLC	ITC	FLC
<i>T. inunguis</i>	Oral	<i>C. albicans</i> (n=26)	0,25 - 1	0,03 - 16	0,125 - 64	13	6
		<i>C. parapsilosis stricto sensu</i> (n=3)	0,06 - 0,25	0,03 - 0,06	0,5 - 2	-	-
		<i>C. orthopsilosis</i> (n=1)	0,25	<0,03	0,5	-	-
	Nasal	<i>C. guilliermondii</i> (n=2)	0,25	0,06 - 0,25	1 - 8	-	-
		<i>C. glabrata</i> (n=1)	0,25	0,125	4	-	-
		<i>C. parapsilosis stricto sensu</i> (n=3)	0,125 - 0,25	0,03	1 - 2	-	-
		<i>C. metapsilosis</i> (n=1)	0,25	0,03	4	-	-
		<i>C. cifferi</i> (n=1)	0,25	0,125	4	-	-
		Genital	<i>C. albicans</i> (n=11)	0,25 - 1	0,03 - 16	0,125 - 32	7
	<i>C. guilliermondii</i> (n=3)		0,125 - 1	0,125 - 0,25	2 - 8	-	-
	<i>C. krusei</i> (n=1)		1	0,125	16	-	-
	<i>C. norvegensis</i> (n=1)		0,03	0,06	1	-	-
	<i>C. parapsilosis stricto sensu</i> (n=4)		0,06 - 0,25	0,03	1 - 4	-	-
	<i>C. orthopsilosis</i> (n=1)		0,125	0,03	0,5	-	-
	<i>C. pelliculosa</i> (n=1)		0,25	0,03	2	-	-
	<i>C. tropicalis</i> (n=1)		0,5	8	64	1	1
	Retal	<i>C. albicans</i> (n=3)	0,25 - 0,5	4 - 16	4 - 32	3	2
		<i>C. famata</i> (n=1)	1	0,25	8	-	-

		<i>C. glabrata</i> (n=1)	0,25	0,125	2	-	-
		<i>C. guilliermondii</i> (n=4)	0,125 – 0,5	0,03 - 16	0,5 - 4	1	-
		<i>C. parapsilosis stricto sensu</i> (n=6)	0,125 – 0,25	0,03 – 0,06	0,25 - 2	-	-
		<i>C. orthopsilosis</i> (n=1)	0,125	0,03	2	-	-
		<i>C. metapsilosis</i> (n=2)	0,25	0,03	0,25-1	-	-
		<i>C. pelliculosa</i> (n=2)	0,125 – 0,5	0,06 – 0,125	2 - 4	-	-
		<i>C. tropicalis</i> (n=1)	0,5	16	64	1	1
<i>T. manatus</i>	Oral	<i>C. albicans</i> (n=9)	0,25 - 0,5	0,03 - 16	0,125 - 64	5	5
		<i>C. famata</i> (n=2)	0,125 – 0,25	0,03 – 0,06	1 - 4	-	-
		<i>C. tropicalis</i> (n=1)	0,25	0,03	32	-	1
		<i>C. guilliermondii</i> .(n=1)	0,125	0,03	2	-	-
	Nasal	<i>C. albicans</i> (n=3)	0,25 - 1	0,03 – 16	0,125 - 64	1	1
		<i>C. tropicalis</i> (n=1)	0,5	0,03	0,5	-	-
	Genital	<i>C. guilliermondii</i> (n=1)	0,125	0,03	1	-	-
		<i>C. tropicalis</i> (n=2)	0,25 – 0,5	0,03 - 1	0,125 - 2	1	-
	Retal	<i>C. famata</i> (n=2)	0,125	0,03	0,25 - 1		
		<i>C. guilliermondii</i> (n=1)	0,125	0,03	1	-	-
		<i>C. krusei</i> (n=1)	1	0,06	8	-	-

6.3.2 Cetáceos

Os isolados de *Candida* spp. testados (n=9) apresentaram CIMs para Anfotericina B variando de 0,06 a 0,5µg/mL, não sendo observada resistência a essa droga. Com relação aos azólicos, as CIMs variaram de 0,03 a 16µg/mL para itraconazol e de 0,25 a 64µg/mL para fluconazol. Dentre as cepas avaliadas, 22,2% (2/9) apresentaram resistência aos dois derivados azólicos. Cepas resistentes foram obtidas do espiráculo e abertura genital de um espécime de *K. sima*, ambas pertencentes à espécie *C. tropicalis*, com o índice de resistência de 33,3% (2/6). Os dois isolados de *Candida* sp. obtidos a partir de *I. geoffrensis* não foram avaliados quanto a sensibilidade devido à contaminação dos estoques em solução salina. Os valores de CIM obtidos para os isolados de *Candida* spp. de cetáceos encontram-se descritos na tabela 6.

Tabela 6. Perfil de sensibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida* spp. isoladas de cetáceos

Hospedeiro	Sítio	Espécie de levedura	CIM			Isolados resistentes	
			AMB	ITC	FLC	ITC	FLC
<i>P. electra</i>	Oral	Complexo <i>C. parapsilosis</i> (n=1)	0,25	0,125	2	-	-
<i>K. sima</i>	Oral	<i>C. tropicalis</i> (n=1)	0,5	0,03	2	-	-
	Espiráculo	<i>C. tropicalis</i> (n=2)	0,25	0,03 – 16	2 – 8	1	1
	Genital	<i>C. tropicalis</i> (n=2)	0,125 – 0,5	0,03 – 16	0,25 – 64	1	1
	Retal	<i>C. tropicalis</i> (n=1)	0,5	0,03	0,25	-	-
		<i>C. famata</i> (n=1)	0,06	0,125	16	-	-
<i>K. breviceps</i>	Espiráculo	Complexo <i>C. parapsilosis</i> (n=1)	0,125	0,06	1	-	-

6.4 Fatores de virulência

6.4.1 Fosfolipases

6.4.1.1 Sirênios

Os isolados de *Candida* sp. de *T. inunguis* e *T. manatus* (n=105) foram submetidos ao teste de produção de fosfolipase, cujos resultados encontram-se descritos na tabela 7. Dentre as cepas avaliadas, 32,4% (34/105) foram negativas ($P_z=1$), 52,4% (55/105) foram positivas ($1 > P_z \geq 0,64$) e 15,2% (16/105) foram fortemente positivas ($P_z < 0,64$) para a produção de fosfolipases, com perfil similar para as duas espécies de hospedeiros.

As espécies de *Candida* que apresentaram maior atividade enzimática foram: *C. albicans* (51/52), *C. glabrata* (2/2), *C. krusei* (2/2), *C. pelliculosa* (3/3) e *C. tropicalis* (4/6). *C. albicans* apresentou uma produção de fosfolipases significativamente maior ($P < 0,0001$) do que as outras espécies. Uma correlação positiva foi encontrada entre as CIMs de anfotericina B e a produção de fosfolipases ($P=0,007$).

Tabela 7. Produção de fosfolipases por cepas de *Candida* spp. isoladas de sirênios.

Espécie de <i>Candida</i>	<i>T. inunguis</i>			<i>T. manatus</i>		
	Negativa	Positiva	Fortemente	Negativa	Positiva	Fortemente
	(Pz=1)	(1>Pz ≥0,64)	positiva (Pz<0,64)	(Pz=1)	(1>Pz ≥0,64)	positiva (Pz<0,64)
<i>C. albicans</i>	1	33	6	-	9	3
<i>C. ciferri</i>	1	-	-	-	-	-
<i>C. famata</i>	1	-	-	3	1	-
<i>C. glabrata</i>	-	1	1	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	4	4	1	2	1	-
<i>C. krusei</i>	-	1	-	-	1	-
<i>C. norvegensis</i>	1	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> <i>stricto sensu</i>	14	1	-	-	-	-
<i>C. orthopsilosis</i>	3	-	-	-	-	-
<i>C. metapsilosis</i>	2	-	1	-	-	-
<i>C. pelliculosa</i>	-	-	3	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	1	1	-	1	2	1
TOTAL	28	41	12	6	14	4

6.4.1.2 Cetáceos

Dentre as cepas de *Candida* spp. isoladas a partir de cetáceos, 22,2% (2/9) foram negativas (Pz=1), 66,7% (6/9) foram positivas (1>Pz ≥0,64) e 11,1% (1/9) fortemente positivas (Pz<0,64) para a produção de fosfolipases (Tabela 8). Os isolados negativos pertenciam as espécies *C. tropicalis* (1/2) e Complexo *C. parapsilosis* (1/2), as cepas positivas eram Complexo *C. parapsilosis* (1/6) e *C. tropicalis* (5/6) e a única cepa fortemente positiva era *C. famata*. Um elevado percentual de produção de fosfolipases foi observado em *C. tropicalis*, sendo este de 83,3% (5/6). Os dois isolados de *Candida* sp. obtidos a partir de *I. geoffrensis* não foram avaliados quanto a produção de fosfolipases devido à contaminação dos estoques em solução salina. Considerando os dois isolados de cetáceos que apresentaram resistência aos derivados azólicos, apenas em um foi verificada a produção de fosfolipases.

Tabela 8. Produção de fosfolipases por cepas de *Candida* spp. isoladas de cetáceos.

Hospedeiro	Espécie de <i>Candida</i>	Negativa (Pz=1)	Positiva (1>Pz ≥0,64)	Fortemente positiva (Pz<0,64)
<i>P. electra</i> (n=1)	Complexo <i>C. parapsilosis</i>	1	-	-
<i>K. breviceps</i> (n=1)	Complexo <i>C. parapsilosis</i>	-	1	-
<i>K. sima</i> (n=2)	<i>C. famata</i>	-	-	1
	<i>C. tropicalis</i>	1	5	-
TOTAL		2	6	1

6.4.2 Proteases

6.4.2.1 Sirênios

Os isolados de *Candida* sp. de *T. inunguis* e *T. manatus* (n=105) foram submetidos ao teste de produção de proteases, cujos resultados encontram-se descritos na tabela 9. Dentre as cepas avaliadas, 49,5% (52 /105) foram negativas (Pz=1) e 50,5% (53/105) foram positivas (Pz< 1) para a produção de proteases, com perfil similar para as duas espécies de hospedeiros.

Um maior percentual de produção de proteases foi verificado para *C. albicans*, visto que 88,5% (46/52) dos isolados foram positivos. Foi observada uma correlação positiva entre os valores de CIMs de itraconazol e a produção de proteases (P=0,043).

Tabela 9. Produção de proteases por cepas de *Candida* spp. isoladas de sirênios.

Espécie de <i>Candida</i>	<i>T. inunguis</i>		<i>T. manatus</i>	
	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva
	(Pz=1)	(Pz<1)	(Pz=1)	(Pz<1)
<i>C. albicans</i>	5	35	1	11
<i>C. ciferri</i>	1	-	-	-
<i>C. famata</i>	1	-	4	-
<i>C. glabrata</i>	2	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	9	-	3	-
<i>C. krusei</i>	1	-	1	-
<i>C. norvegensis</i>	1	-	-	-
<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	11	4	-	-
<i>C. orthopsilosis</i>	2	1	-	-
<i>C. metapsilosis</i>	3	-	-	-
<i>C. pelliculosa</i>	3	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	1	1	3	1
TOTAL	40	41	12	12

6.4.2.2 Cetáceos

Dentre as cepas de *Candida* spp. isoladas a partir de cetáceos, 55,6% (5/9) foram negativas (Pz=1) e 44,6% (4/9) foram positivas (Pz<1) (Tabela 10). Os isolados não produtores pertenciam as espécies *C. tropicalis* (2/5), Complexo *C. parapsilosis* (2/5) e *C. famata* (1/5), enquanto as cepas positivas eram da espécie *C. tropicalis* (4/4). Um moderado percentual de produção de proteases foi observado em *C. tropicalis*, sendo este de 66,6% (4/6). Os dois isolados de *Candida* sp. obtidos a partir de *I. geoffrensis* não foram avaliados quanto a produção de proteases devido à contaminação dos estoques em solução salina. Não foi verificada a produção de proteases nos dois isolados de cetáceos que apresentaram resistência aos derivados azólicos.

Tabela 10. Produção de proteases por cepas de *Candida* spp. isoladas de cetáceos.

Hospedeiro	Espécie de <i>Candida</i>	Negativa (Pz=1)	Positiva (Pz<1)
<i>P. electra</i> (n=1)	Complexo <i>C. parapsilosis</i>	1	-
<i>K. breviceps</i> (n=1)	<i>C. parapsilosis</i>	1	-
<i>K. sima</i> (n=2)	<i>C. famata</i>	1	-
	<i>C. tropicalis</i>	2	4
TOTAL		5	4

6.4.3 Biofilme

6.4.3.1 Sirênios

Todos os isolados de *Candida* spp. obtidos de sirênios (n=105) foram testados quanto a produção de biofilme. Não houve produção em 67,6% (71/105), produção fraca em 21,9% (23/105), produção moderada em 6,7% (7/105) e produção forte em 3,8% (4/105) das cepas (Tabela 11).

As espécies de *Candida* que apresentaram maior percentual de produção de biofilme foram *C. tropicalis* com 66,7% (4/6), *C. orthopsilosis* com 66,7% (2/3), *C. krusei* com 50% (1/2) e *C. parapsilosis sensu stricto* com 46,7% (7/15). Dentre as cepas nas quais foi verificada resistência a pelo menos um dos derivados azólicos, 31,2% (10/32) de *C. albicans* e 75% (3/4) de *C. tropicalis* apresentaram produção de biofilme em escala variando de fraca a forte, não sendo possível estabelecer uma correlação entre esses dois aspectos. Particularmente, observou-se que os isolados resistentes de *C. albicans* de peixe-boi-marinho apresentaram maior percentual de produção de biofilme (83,3%), do que aqueles provenientes de peixe-boi-da-Amazônia (19,2%).

Tabela 11. Produção de biofilme por cepas de *Candida* spp. isoladas de sirênios.

Espécie de <i>Candida</i>	<i>T. inunguis</i>				<i>T. manatus</i>			
	N	F	M	FO	N	F	M	FO
<i>C. albicans</i>	32	7	-	1	3	8	-	1
<i>C. ciferri</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. famata</i>	1	-	-	-	4	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	6	-	2	1	3	-	-	-
<i>C. krusei</i>	1	-	-	-	-	-	1	-
<i>C. norvegensis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	8	4	3	-	-	-	-	-
<i>C. orthopsilosis</i>	1	1	1	-	-	-	-	-
<i>C. metapsilosis</i>	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. pelliculosa</i>	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	-	1	-	1	2	2	-	-
TOTAL	59	13	6	3	12	10	1	1

N= não produtora; F= fraca; M = moderada; FO= forte

6.4.3.2 Cetáceos

Dentre as cepas de *Candida* spp. isoladas a partir de cetáceos, 33,3% (3/9) foram não produtoras de biofilme, 11,1% (1/9) foram fracamente produtoras, 22,2% (2/9) foram produtoras moderadas e 33,3% (3/9) foram fortes produtoras (Tabela 12). Os isolados negativos pertenciam as espécies *C. famata* (1/3), Complexo *C. parapsilosis* (1/3) e *C. tropicalis* (1/3), o único isolado fracamente produtor era do Complexo *C. parapsilosis*, enquanto as cepas produtoras moderadas (2/2) e fortemente produtoras (3/3) eram *C. tropicalis*. Os dois isolados de *Candida* sp. obtidos a partir de *I. geoffrensis* não foram avaliados quanto a produção de proteases devido à contaminação dos estoques em solução salina. Um elevado percentual de produção de biofilme foi observado em *C. tropicalis*, sendo este de 83,3% (5/6). Um isolado de *C. tropicalis* resistente aos derivados azólicos apresentou forte produção de biofilme.

Tabela 12. Produção de biofilme por cepas de *Candida* spp. isoladas de cetáceos.

Hospedeiro	Espécie de <i>Candida</i>	Não produtora	Fraca	Moderada	Forte
<i>P. electra</i> (n=1)	Complexo <i>C. parapsilosis</i>	-	1	-	-
<i>K. breviceps</i> (n=1)	Complexo <i>C. parapsilosis</i>	1	-	-	-
<i>K. sima</i> (n=2)	<i>C. famata</i>	1	-	-	-
	<i>C. tropicalis</i>	1	-	2	3
TOTAL		3	1	2	3

6.5 Diagnóstico de doenças fúngicas

Dois relatos de casos de micose cutânea superficial foram descritos em filhotes de peixes-bois mantidos em cativeiro, sendo um em peixe-boi-da-Amazônia (Caso 1) e outro em peixe-boi-marinho (Caso 2). Um surto de micose cutânea foi observado em oito peixes-bois-marinhos mantidos em reabilitação no CRMM/AQUASIS. Nenhum caso foi relatado a partir de cetáceos encalhados no litoral do Ceará, nem de botos-vermelhos de vida livre capturados no Rio Negro, Amazonas.

6.5.1 Sirênios

Caso clínico 1

A partir das escamas de pele coletadas de um filhote de peixe-boi-da-Amazônia foi observado o crescimento de dois tipos de colônias de leveduras: uma de textura glabrosa, de cor bege e relevo côncavo; outra rugosa, de cor bege e relevo cerebriforme. Foram identificadas as espécies *C. tropicalis*, por meio de testes fenotípicos, e *T. asahii* através de sequenciamento. Tendo em vista que houve isolamento de *Trichosporon* sp. na cavidade oral e abertura genital do animal, sugere-se que esse agente esteja mais relacionado a levedurose cutânea diagnosticada.

Não foi instituído nenhum tratamento sistêmico com antifúngicos a partir da identificação dos agentes etiológicos envolvidos por se tratar de uma micose cutânea superficial. O animal era mantido em recinto totalmente sombreado, compartilhado com outro

filhote. Apesar do contato direto frequente entre os dois animais, não foi observada a presença de lesões cutâneas no outro espécime. Após a transferência para recinto aberto, com exposição direta ao sol, foi relatada a regressão das lesões

Caso clínico 2

Após o cultivo dos fragmentos de pele foi observado o crescimento de colônias de coloração enegrecida, textura arenosa e reverso preto nos tubos com ágar Sabouraud e Sabouraud acrescido de cloranfenicol. No microcultivo foram verificadas hifas de coloração amarronzada e septadas, conidióforos eretos, não-ramificados, septados, apicalmente direcionados, com conídios cilíndricos, lisos, de paredes espessas, com três a sete septos, permitindo a identificação da espécie *Bipolaris hawaiiensis* (Figura 6). Este caso consistiu no primeiro relato de feohifomicose em mamíferos aquáticos.



Figura 6. Microcultivo de *B. hawaiiensis*, mostrando conidióforos eretos com conídios apicais. No detalhe, conídio cilíndrico com cinco septos.

A partir da identificação do agente etiológico foi instituído o tratamento com itraconazol na dose de 2,5mg/kg, por via oral, uma vez ao dia, durante 14 dias. Foi observada a evolução

positiva das lesões e boa resposta ao tratamento. Apesar da descamação intensa da pele, uma vez que o animal estava em fase de muda natural, lesões fúngicas não foram observadas nas camadas subjacentes às áreas afetadas. Alterações hematológicas significativas não foram detectadas durante o curso da doença, sendo observada apenas uma linfopenia moderada no momento do diagnóstico. Os níveis séricos de transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) duplicaram após o fim do tratamento com itraconazol.

Caso clínico 3

No cultivo de fragmentos de pele de 50% dos animais (4/8) foi observado o crescimento de colônias de textura algodoadosa, com micélio aéreo, cor branca e reverso alaranjado. No microcultivo foram observadas hifas hialinas, septadas, com microconídios arredondados abundantes e macroconídios em forma de banana, permitindo a identificação do gênero *Fusarium* sp. Apesar de não ter havido crescimento fúngico a partir do material biológico dos outros 50% (4/8) dos filhotes, a observação das lesões idênticas, inclusive em animais que compartilhavam recintos com outros comprovadamente infectados, permitiu o diagnóstico presuntivo de dermatite pelo mesmo agente nesses espécimes. Dessa forma, sugere-se que ocorreu um surto de fusariose cutânea em peixes-bois-marinheiros mantidos no CRMM/AQUASIS ao longo de um ano.

O tratamento dos animais foi estabelecido individualmente, de acordo com a porcentagem do corpo acometido, persistência das lesões e evolução do quadro clínico (Quadro 2). Quatro peixes-bois foram tratados com itraconazol (2,5mg/Kg) por via oral, uma ou duas vezes ao dia, durante 21 a 60 dias, ou através de pulsoterapia, obtendo-se a cura clínica ao final do período. Nesses casos, o desaparecimento das lesões foi verificado de 20 a 45 dias após o início do tratamento. Nos locais anteriormente afetados foi observada a substituição das lesões por tecido esbranquiçado. Houve recidiva do quadro após 7 a 35 dias do final do tratamento em 25% dos casos (2/8), sendo necessária a repetição do uso de antifúngico em um dos animais, enquanto em outro houve regressão das lesões. Quatro animais não foram tratados devido à distribuição pontual das lesões e regressão espontânea de 14 a 45 dias após o diagnóstico. Não foram verificados sinais clínicos de prurido, perda de peso ou alterações hematológicas durante todo o curso da doença nos oito filhotes.

Quadro 2. Evolução do quadro clínico de filhotes de peixe-boi-marinho com dermatite por *Fusarium* sp.

Registro	Cultura	Tratamento	Evolução
02S0111/63	<i>Fusarium</i> sp.	Tratamento com itraconazol (SID) iniciado em 09/04/14, com duração de 60dias. Recidiva constatada após 35 dias. Iniciado novo tratamento com itraconazol (BID) em 12/07/14, com duração de 56 dias.	Não houve resposta clínica esperada com o uso de itraconazol administrado uma vez ao dia. No segundo ciclo de tratamento, com maior frequência de uso, houve lenta resposta, havendo regressão das lesões em 04/09/14. Uma recidiva foi constatada em 10/10, porém optou-se por não realizar tratamento, com completa regressão das lesões em 23/10/14.
08S0112/17	<i>Fusarium</i> sp	Pulsoterapia com itraconazol (BID) iniciada em 30/07/14, finalizada em 20/08/14. Devido a permanência das lesões, foi iniciado um novo tratamento em 28/08/14.	Não houve resposta ao primeiro tratamento, havendo completa regressão das lesões em 04/09/14.
02S0111/65	Negativa	Não foi realizado tratamento com antifúngico devido à distribuição focal das lesões, sem disseminação.	Regressão espontânea das lesões em 45 dias.
02S0111/66	<i>Fusarium</i> sp	Não foi realizado tratamento com antifúngico devido à distribuição focal das lesões, sem disseminação.	Regressão espontânea das lesões em 45 dias após o diagnóstico clínico.
08S0112/19	<i>Fusarium</i> sp	Pulsoterapia com itraconazol iniciada em 02/03/15, finalizada em 24/03/15.	Houve completa regressão das lesões ao final do tratamento. Foi observada uma recidiva do quadro em 31/03/15, com evolução positiva em uma semana. Nesse período o animal estava compartilhando o recinto com 02S0111/71, que apresentava quadro em curso.
02S0111/68	Negativa	Tratamento com itraconazol iniciado em 07/03/15, com duração de 21 dias.	Houve boa resposta ao tratamento, com completa regressão das lesões em 24/03/15.

02S0112/70	Negativa	Não foi realizado tratamento com antifúngico devido à distribuição focal das lesões, sem disseminação.	Regressão espontânea das lesões em 21 dias após o diagnóstico clínico.
02S0111/71	Negativa	Não foi realizado tratamento com antifúngico devido à distribuição focal das lesões, sem disseminação.	Regressão espontânea das lesões em 14 dias após o diagnóstico clínico.

6.5.2 Cetáceos

Não foram observados sinais clínicos de doenças fúngicas nos cetáceos encalhados vivos (0/9) enquanto estavam em reabilitação, nem verificadas lesões nos órgãos internos durante as necropsias dos espécimes que vieram à óbito (8/9). Dentre os cetáceos avaliados, destaca-se o caso de um filhote de *K. sima*, mantido em reabilitação durante um mês no CRMM/AQUASIS, que apresentou colonização por *C. tropicalis* em todas as suas cavidades naturais em coleta realizada um dia antes de vir à óbito. Três dias antes o animal havia saltado para fora do tanque de reabilitação, sendo diagnosticada uma severa hemorragia abdominal e peritonite em consequência do traumatismo. Apesar de não terem sido observadas placas esbranquiçadas nas mucosas do animal, características de casos de candidíase pseudomembranosa, esse achado reforça o potencial de infecção de leveduras em animais imunossuprimidos, submetidos a corticoterapia e antibioticoterapia. Não foram observadas lesões cutâneas sugestivas de etiologia fúngica nos botos-vermelhos capturados no Rio Negro, estado do Amazonas.

6.6 Tipagem por sequenciamento de multilocus (MLST) de *C. albicans*

Dentre os 52 isolados de *C. albicans* obtidos a partir de sirênios, 45 foram submetidos à tipagem molecular por MLST, sendo 33 de *T. inunguis* e 12 de *T. manatus*. Sete cepas não foram avaliadas devido a impossibilidade de recuperá-las a partir do estoque em solução salina. Adicionalmente foram incluídos dois isolados de *C. albicans* obtidos a partir de onicomicose em dois funcionários envolvidos no manejo de peixes-bois-da-Amazônia no CPPMA.

Considerando os sete genes estudados, com tamanhos de fragmentos variando de 373 a 491pb, 2.883 nucleotídeos de cada cepa foram analisados. O total de nucleotídeos sequenciados

dos 45 isolados foi de 129.735. Foram identificados 70 genótipos, sendo 11 para o gene AAT1, 8 para ACC1, 8 para ADP1, 9 para MPI, 11 para SYA1, 12 para VPS13 e 11 para ZWF1. Um novo genótipo foi cadastrado na base de dados sob o número 243 para o gene ZWF1. Dentre os 45 isolados foram observados 33 tipos de sequências (DST), sendo 27 novos tipos. Os números de alelos, sequências e clados encontram-se descritos na tabela 13.

As cepas de sirênios avaliadas pertenciam a cinco clados, 1, 8, 9, 11 e 17, dentre os 18 existentes até o presente momento para *C. albicans*. Os isolados de *T. inunguis* foram incluídos nos clados 8 (21/33; 63,7%), 9 (6%; 2/33) e 11 (10/33; 30,3%), enquanto as cepas de *T. manatus* estavam nos clados 1 (1/12; 8,4%); 8 (6/12; 50%) e 17 (5/12; 41,6%) (Figura 7). Foram encontradas 23 DSTs dentre os 33 isolados de *T. inunguis*, enquanto 11 DSTs foram detectadas nos 12 isolados de *T. manatus*. Uma DST (2222) foi compartilhada entre os dois hospedeiros. Os dois isolados de humanos pertenciam ao clado 8 e 16.

O tipo de sequência mais comum foi a de número 1029, encontrada em cinco peixes-bois-da-Amazônia diferentes (5/45; 11,1%). Quatro desses animais se encontravam no mesmo recinto, indicando o potencial compartilhamento de microorganismos entre os espécimes. A DST 90 foi detectada em três cepas de indivíduos distintos de *T. inunguis* (3/45; 6,67%) mantidos em recintos separados, indicando que há fluxo de microrganismos na instituição. A DST 2222 foi observada em três cepas (3/45; 6,67%), duas de *T. manatus* e uma de *T. inunguis*, ambas em espécimes diferentes. Três DSTs (461, 2211 e 2216) foram encontradas em duas cepas, cada uma (2/45; 4,45% cada), provenientes de espécimes distintos de peixes-bois-da-Amazônia. Duas cepas apresentaram a DST 774, tendo sido isoladas de sítios anatômicos diferentes de um mesmo peixe-boi-da-Amazônia, indicando que a colonização da microbiota pode se dar por possíveis clones. Cepas com DSTs diferentes (2200 e 2222) também foram isoladas de dois sítios anatômicos de um mesmo peixe-boi-marinho, ambas pertencentes ao clado 8. Cepas pertencentes ao clado 8 (ST 2223) e 11 (ST 2216) foram obtidas a partir de um mesmo peixe-boi-da-Amazônia.

Tabela 13. Perfil de alelos e número de sequências correspondente dos isolados de *C. albicans* de sirênios.

Cepa	Hospedeiro	AAT1	ACC1	ADP1	MPI	SYA1	VPS13	ZWF1	DST	ID	Clado	Resistência*
1O	<i>T. inunguis</i>	33	7	14	54	6	45	15	2199	2372	8	Não
7O	<i>T. inunguis</i>	55	14	4	54	114	45	15	2221	2404	8	Sim
9O	<i>T. inunguis</i>	62	3	3	3	3	39	95	918		9	Não
10O	<i>T. inunguis</i>	33	14	4	54	34	45	15	2211	2405	8	Sim
13O	<i>T. inunguis</i>	33	14	4	54	6	45	15	1029	2382	8	Sim
14O	<i>T. inunguis</i>	55	14	4	54	6	45	15	602	2373	8	Não
15O	<i>T. inunguis</i>	33	14	4	54	6	45	15	1029	2383	8	Sim
16O	<i>T. inunguis</i>	33	14	4	54	6	45	15	1029	2406	8	Sim
17O1	<i>T. inunguis</i>	33	14	4	54	6	45	15	1029	2384	8	Sim
18O	<i>T. inunguis</i>	33	14	4	54	6	45	15	1029	2385	8	Sim
21G	<i>T. inunguis</i>	33	14	4	54	6	45	40	2207	2386	8	Sim
23G	<i>T. inunguis</i>	60	27	21	1	35	11	29	2201	2375	11	Sim
24G	<i>T. inunguis</i>	37	27	21	1	35	45	15	2208	2387	11	Sim
25O	<i>T. inunguis</i>	25	7	6	3	6	27	37	90	2388	8	Sim
26O	<i>T. inunguis</i>	25	7	6	9	6	27	37	2222	2407	8	Sim
30O	<i>T. inunguis</i>	25	7	6	3	6	27	37	90	2376	8	Não
32O1	<i>T. inunguis</i>	62	3	3	3	3	15	95	2209	2389	9	Sim
35G	<i>T. inunguis</i>	37	27	21	1	35	11	15	2202	2377	11	Sim

35O	<i>T. inunguis</i>	33	7	4	54	6	45	15	2210	2390	8	Sim
36O	<i>T. inunguis</i>	33	14	4	54	34	45	15	2211	2391	8	Não
37G	<i>T. inunguis</i>	60	10	21	1	2	218	15	2212	2392	11	Sim
38G	<i>T. inunguis</i>	60	10	21	1	7	11	15	461	2393	11	Sim
39G	<i>T. inunguis</i>	60	10	21	1	7	11	13	2213	2394	11	Sim
40G	<i>T. inunguis</i>	60	27	21	1	35	11	15	2203	2378	11	Não
41O1	<i>T. inunguis</i>	25	7	6	3	6	20	37	2214	2395	8	Não
42O	<i>T. inunguis</i>	60	10	21	1	7	11	15	461	2396	11	Sim
43O	<i>T. inunguis</i>	25	7	6	3	34	27	37	2215	2397	8	Não
44O1	<i>T. inunguis</i>	33	14	4	3	6	45	15	774		8	Não
44G1	<i>T. inunguis</i>	33	14	4	3	6	45	15	774		8	Não
45O	<i>T. inunguis</i>	25	7	6	3	6	27	37	90	2408	8	Sim
46G	<i>T. inunguis</i>	60	10	21	1	34	11	15	2216	2398	11	Não
49G1	<i>T. inunguis</i>	60	10	21	1	34	11	15	2216	2399	11	Sim
49O1	<i>T. inunguis</i>	25	7	6	14	6	27	37	2223	2409	8	Sim
51N	<i>T. manatus</i>	25	7	6	9	6	27	37	2222	2410	8	Sim
51O	<i>T. manatus</i>	25	7	6	136	6	27	37	2200	2374	8	Sim
55O	<i>T. manatus</i>	47	3	35	136	44	20	6	2204	2379	17	Sim
57O	<i>T. manatus</i>	2	2	5	28	2	6	5	2217	2400	1	Sim
58O	<i>T. manatus</i>	47	3	35	28	18	20	6	2901		17	Não
60O	<i>T. manatus</i>	25	7	6	3	114	30	37	2902		8	Sim

61O	<i>T. manatus</i>	25	7	6	9	6	27	37	2222	2411	8	Sim
62O	<i>T. manatus</i>	25	14	6	3	6	27	37	2205	2380	8	Não
63O	<i>T. manatus</i>	25	7	6	14	6	27	243	2224	2412	8	Não
66N	<i>T. manatus</i>	59	5	21	2	80	108	47	2218	2401	17	Não
67O	<i>T. manatus</i>	59	5	21	2	80	205	47	2219	2402	17	Não
69N	<i>T. manatus</i>	59	14	21	2	80	27	15	2206	2381	17	Não
H1	Humano/ Onicomicose	53	31	10	36	83	182	111	2220	2403	16	Sim
H2	Humano/ Onicomicose	27	14	4	54	6	45	15	2900		8	Não

*Resistência a pelo menos um dos derivados azólicos testados (itraconazol e fluconazol)

7. DISCUSSÃO

Esse estudo apresentou uma abordagem multidisciplinar sobre o isolamento de fungos a partir de mamíferos aquáticos, com destaque para as leveduras. Dentre os poucos trabalhos publicados sobre a caracterização da microbiota de sirênios, este consiste na primeira avaliação sistemática para isolamento de leveduras desses animais. As mucosas das cavidades naturais de *T. inunguis* e *T. manatus* se mostraram colonizadas por leveduras de diversas espécies, demonstrando que esses microrganismos fazem parte da microbiota da cavidade oral, narinas, abertura genital e reto. Apenas o trabalho de Nielsen et al. (2013) revelou isolamento de leveduras a partir de amostras de sirênios, no qual obtiveram duas cepas de *Candida* spp., sendo uma da pele e outra das fezes, e uma cepa de *Cryptococcus humicolus* das narinas de carcaças de dugongos na Austrália.

A microbiota leveduriforme de *T. inunguis* se mostrou quantitativamente mais representativa e diversa quando comparada a de *T. manatus*. Diferenças nas taxas de isolamento em função da salinidade e tratamento químico da água podem estar envolvidas, visto que os peixes-bois-da-Amazônia avaliados eram mantidos em água doce, não clorada, enquanto os peixes-boi-marinhos ficavam em recintos com água salgada e clorada. A maioria dos animais avaliados foram resgatados e levados para reabilitação quando eram neonatos ou filhotes, diminuindo as chances de colonização por leveduras durante a breve permanência no ambiente natural, bem como pelo pouco contato com as mães. Nas três instituições pesquisadas havia contato dos animais com humanos durante os manejos biomédicos e alimentação, especialmente com os filhotes em fase de amamentação. Possíveis fatores que podem explicar as maiores taxas de isolamento em *T. inunguis* são a maior proximidade dos recintos com a flora circundante e com outros animais silvestres, principalmente aves, que são mantidos em reabilitação no CPPMA. De acordo com Martins et al. (2002) e Buck et al. (2006), as condições ambientais artificiais, o uso de antibióticos, a composição da água inadequada, o contato com animais terrestres, seres humanos e flora circundante são fatores que favorecem a maior prevalência de leveduras em mamíferos marinhos em cativeiro.

Leveduras do gênero *Candida* foram as mais isoladas em ambos os hospedeiros, destacando-se a elevada prevalência de *C. albicans* nas duas espécies. Em outros mamíferos aquáticos, como golfinhos-nariz-da-garrafa, *Candida* spp. são mais prevalentes em animais de

cativeiro do que em animais de vida livre, sendo *C. albicans* a principal espécie isolada (BUCK, 1980; BUCK et al., 2006; AVALOS-TÉLLEZ et al., 2010).

Leveduras do gênero *Trichosporon* sp. foram isoladas de todos os sítios anatômicos de peixes-boi-da-Amazônia, hospedeiro no qual apresentaram maior potencial de colonização. A identificação molecular de alguns destes isolados revelou elevada prevalência de *Trichosporon asahii*. A menor tolerância da maioria das espécies de *Trichosporon* sp. a ambientes salinos, com exceção de *T. mucoides* (GUNDE-CIMERMAN et al., 2009), pode ter contribuído para a baixa prevalência em peixes-bois-marinho, que são mantidos em piscinas de água salgada. O contrário foi observado com relação ao gênero *Rhodotorula* sp., que inclui varias espécies halotolerantes (BUTINAR et al., 2005), o qual apresentou prevalência mais elevada em peixe-boi-marinho do que em peixe-boi-da-Amazônia.

A colonização mista num sítio anatômico de um mesmo indivíduo foi observada principalmente em peixes-bois-da-Amazônia e em recintos com elevada densidade de animais. As taxas de isolamento também foram mais elevadas em tanques com mais de 10 animais, que compartilham pelo menos uma espécie de levedura predominante nos seus sítios anatômicos. Este achado pode indicar uma maior contaminação da água nesses recintos, sendo recomendada uma melhoria no sistema de tratamento de água desses centros de reabilitação para minimizar os riscos de infecções oportunistas por leveduras.

Dentre os sítios anatômicos pesquisados, a maior prevalência de leveduras foi observada na abertura genital de ambas as espécies de hospedeiros. Um menor número de swabs genitais e retais foi coletado devido a dificuldades operacionais na contenção de animais de maior porte, principalmente fêmeas e em peixes-bois-marinhos, o que pode ter subestimado as taxas de isolamento nesses sítios e gênero. A cavidade oral se mostrou mais colonizada por *C. albicans* nos dois hospedeiros. Na abertura genital e reto de *T. inunguis* foi observada uma maior diversidade de espécies de leveduras, principalmente de *Candida* spp. Na mucosa genital observou-se uma maior prevalência de *C. albicans*, *Trichosporon* sp. e *C. parapsilosis sensu stricto*, enquanto na mucosa retal *Trichosporon* sp. foi mais prevalente. Nesses mesmos sítios anatômicos de *T. manatus* foram obtidos poucos isolados devido as limitações nas coletas, o que dificulta a determinação das espécies de leveduras mais importantes para a microbiota. *Rhodotorula* sp. e *C. tropicalis* foram mais prevalentes na abertura genital, enquanto *C. famata* foi mais encontrada no reto. Poucas leveduras foram isoladas a partir das narinas de ambos os hospedeiros, possivelmente devido ao menor contato da mucosa nasal com o ar e água. Peixes-

bois permanecem submersos a maior parte do tempo, com as narinas fechadas, e realizam movimentos de expiração e inspiração rápidos e discretos, (MARSH et al., 2011).

No geral, não houve influência do escore clínico sobre o isolamento de leveduras e contagem de UFC nas duas espécies de hospedeiros, o contrário do observado por Brilhante et al. (2010) em estudo similar com calopsitas, no qual verificaram maiores contagens de UFC em animais com escore clínico baixo. No entanto, observou-se que os únicos neonatos colonizados por leveduras, ambos *T. manatus*, apresentavam baixos escores clínicos. A maior predisposição nesses espécimes se deve possivelmente a imunossupressão existente em animais nessa faixa etária e o contato precoce com condições artificiais. Dessa forma, sugere-se que o isolamento de leveduras a partir de neonatos seja um potencial indicador de saúde frágil. Os demais grupos etários se mostraram susceptíveis a colonização de forma similar. Com relação ao fator sexo, machos de ambas as espécies apresentaram taxas de isolamento superiores as fêmeas. No entanto, esses valores podem não refletir uma real diferença entre os sexos, visto que dentre os animais que não tiveram swabs genitais e/ou retais coletados, a maioria (26/32) era de fêmeas.

Apesar de serem comensais e estarem presentes na microbiota normal, as leveduras são capazes de causar doenças severas em humanos e animais, sobretudo quando há comprometimento da função imune (BRILHANTE et al., 2010). Aparentemente, a ocorrência de zoonoses ocupacionais causadas por leveduras ainda não foi relatada em instituições que lidam com mamíferos aquáticos. No entanto, em trabalho paralelo a esse estudo, verificaram-se quatro casos de onicomicoses causadas por leveduras (*C. albicans*, *C. famata* e *T. asahii*) em profissionais envolvidos no manejo de peixes-bois-da-Amazônia em cativeiro. Todas essas espécies também foram isoladas a partir dos animais. A genotipagem da cepa de *C. albicans* de um tratador revelou a existência de relações filogenéticas próximas com cinco isolados provenientes de *T. inunguis*, indicando a possibilidade de transmissão desses agentes entre humanos e sirênios. Takahashi et al. (2010) pontuaram o risco de transmissão de *Candida* spp. para pessoas com contato próximo com golfinhos-nariz-de-garrafa de cativeiro. Apesar de ainda serem pouco conhecidas, as zoonoses ocupacionais devido à interação entre mamíferos aquáticos doentes e humanos pode aumentar o fluxo de patógenos entre estes e contribuir para a emergência de doenças infecciosas (HUNT et al., 2008).

Apesar do amplo conhecimento sobre a biologia de algumas espécies de sirênios, ainda são escassas as informações sobre os aspectos sanitários em muitas áreas de ocorrência (BONDE et al., 2004; MARSH et al., 2011). No Brasil, estudos sobre a saúde de *T. inunguis* e

T. manatus selvagens e de cativeiro são elencados como prioritários no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Sirênios, visto que algumas subpopulações encontram-se regionalmente mais ameaçadas de extinção do que em nível global (ICMBio, 2011a). O isolamento de leveduras da microbiota amplia o espectro de possíveis agentes etiológicos de doenças infecciosas nesses animais, bem como demonstram a forte influência das condições artificiais sobre a saúde de peixes-bois.

Outro aspecto abordado nesse trabalho foi a avaliação da sensibilidade antifúngica e produção de fatores de virulência por cepas de *Candida* spp. Esse estudo apresentou os primeiros dados sobre o perfil de sensibilidade à antifúngicos em leveduras isoladas a partir de sirênios. Dentre as três espécies onde foi observada resistência aos derivados azólicos, níveis elevados foram encontrados em *C. albicans* e *C. tropicalis*, corroborando com estudos similares realizados outras espécies de hospedeiros, como calopsitas, aves de rapina, emas, cães e camarões (SIDRIM et al., 2010; BRILHANTE et al.; 2012; BRILHANTE et al. 2013; BRITO et al., 2009; BRILHANTE et al., 2011). As origens da resistência podem ser múltiplas. Antifúngicos são raramente utilizados de forma sistêmica na clínica de sirênios, com exceção de pomadas cicatrizantes com múltiplos compostos aplicadas comumente no tratamento tópico de ferimentos e abscessos (BOSSART, 2001; D’AFFONSECA-NETO & VERGARA-PARENTE, 2007). Adicionalmente, o uso de alguns antibacterianos, como metronidazol, pode atuar na seleção de resistência em *Candida* sp. devido ao efeito antifúngico de baixo grau (ARENDRUP, 2013; BEN-AMI et al., 2012).

Acredita-se que a alimentação artificial dos peixes-bois estudados, constituída em sua maioria por vegetais cultivados, representa uma importante fonte de resistência. O uso de azólicos fungicidas na agricultura tem papel relevante na transmissão de resistência na medicina humana e veterinária, devido ao contato das leveduras da microbiota com resíduos presentes nos vegetais consumidos (MULLER et al., 2007; CASTELO-BRANCO et al, 2013). Uma menor prevalência de resistência (20%) foi observada nas cepas isoladas a partir de animais com menos de um ano em cativeiro, quando comparada a indivíduos com 1 a 5 anos (42%), > 5 a 10 anos (32%) e com mais 10 anos (39%). Dessa forma, acredita-se que a exposição prolongada as condições artificiais pode ser um fator de risco na aquisição de resistência.

A qualidade da água de manutenção dos animais em cativeiro também pode representar uma fonte de resistência, visto que existe uma forte influência desta sobre a o perfil de microrganismos que colonizam as mucosas dos animais (VERGARA-PARENTE et al., 2003a).

A origem da água captada para abastecimento dos recintos deve ser criteriosamente selecionada, bem como o sistema de tratamento a ser utilizado, que irão influenciar diretamente na saúde de mamíferos aquáticos em cativeiro (ARKUSH, 2001). A elevada densidade de animais em alguns recintos das instituições pesquisadas também implica numa maior concentração de microrganismos na água, facilitando a disseminação de resistência, e indica a insuficiência dos sistemas de tratamento utilizados.

O contato próximo dos animais em cativeiro com seres humanos, principalmente dos filhotes em fase de aleitamento, também pode favorecer a transmissão de microrganismos resistentes. Com relação as bactérias, o nível de resistência detectado em animais selvagens parece estar relacionado ao grau de associação com seres humanos (SKURNIK et al., 2006). Os achados desse trabalho corroboram com essa hipótese, porém considerando a resistência em leveduras. Apesar de não existirem dados publicados sobre o isolamento de leveduras de sirênios de vida livre, a elevada prevalência de *C. albicans* nas duas espécies de peixe-boi avaliadas indica uma forte influência das condições artificiais sobre a composição da microbiota de animais cativos, visto que é a espécie de levedura comensal e patogênica mais prevalente nos seres humanos (MCMANUS & COLEMAN, 2014). O conhecimento sobre as origens da resistência antimicrobiana nos animais selvagens também é importante para a saúde humana devido ao crescente impacto das zoonoses, bem como a necessidade de prever a emergência de patógenos resistentes (RADHOUANI et al., 2014).

Este estudo também consiste na primeira avaliação sistemática para detecção de fatores de virulência em fungos isolados de mamíferos aquáticos. Considerando os atributos de virulência testados, a produção de fosfolipases e proteases por cepas de *Candida* spp. oriundas de sirênios se mostrou mais importante do que a capacidade de formação de biofilme. A produção de enzimas hidrolíticas e de biofilme estão relacionadas a uma maior patogencidade e resistência aos antifúngicos, respectivamente (SILVA et al., 2012)

A prevalência de genes de virulência é variável entre populações de microrganismos comensais. A microbiota humana é caracterizada por uma maior prevalência de genes de virulência do que a de outros organismos. Nos animais, a presença de genes de virulência aumenta com a massa corporal, o que revela a maior complexidade dos microrganismos comensais intestinais de espécies maiores. Dessa forma, fatores de virulência e mudanças na sua prevalência entre hospedeiros podem refletir mais numa adaptação local para o comensalismo do que em virulência em si (SKURNIK et al., 2008; TENALLION et al., 2010).

Considerando que os peixes-bois são herbívoros de grande porte, que possuem uma vasta microbiota intestinal e que dependem desta para a produção e absorção de nutrientes, sugere-se que a detecção de virulência nos microrganismos desses animais pode estar relacionada principalmente ao comensalismo. Os poucos relatos de infecção por leveduras existentes nos sirênios podem reforçar essa hipótese. No entanto, estudos de patogenicidade dessas cepas se mostram importantes para avaliação da sua correlação com os fatores de virulência que produzem.

A detecção de elevados índices de resistência aos antifúngicos e de produção de fatores de virulência por cepas de *Candida* spp. isoladas de sirênios cativos reforça a influência das condições artificiais sobre a saúde de peixes-bois. As pressões seletivas nos habitats de cepas comensais podem promover o aparecimento de fatores de resistência antimicrobiana e de virulência, tornando-as reservatórios desses fatores (TENAILLON et al., 2010; RADHOUANI et al., 2014).

Tendo em vista que parte desses animais, principalmente *T. manatus*, são mantidos em cativeiro para posterior soltura na natureza, torna-se importante monitorar os índices de resistência e virulência de microrganismos isolados das suas cavidades naturais para uma melhor compreensão impactos a médio e longo prazo sobre as populações selvagens. A coleta de material biológico de animais nativos, bem como de indivíduos já reintroduzidos, é essencial para a avaliação da persistência desses microrganismos e da sua capacidade de disseminação. Como a colonização desses animais por bactérias e fungos pode ser fortemente influenciada por condições artificiais, podem atuar como fonte de genes de resistência e virulência para o ambiente, conespecíficos e outras espécies de animais. Considerando que peixes-bois já são utilizados como sentinelas da proliferação de algas tóxicas e de poluentes, este estudo sugere o potencial uso desses animais como indicadores dos níveis de resistência antimicrobiana nos ambientes aquáticos.

Com relação as leveduras isoladas a partir de cetáceos, esse trabalho consistiu num raro levantamento desses microrganismos em animais encalhados e de vida livre no Brasil. Devido ao pequeno número de espécimes avaliados e pelo fato de pertencerem a distintas espécies, não foi possível fazer maiores inferências sobre o papel de leveduras como constituintes da microbiota. Ademais, os cetáceos encalhados encontravam-se com prognóstico clínico variando

de reservado a ruim, com imundidade comprometida, o que pode favorecer a colonização das cavidades naturais por leveduras oportunistas.

Dentre as leveduras isoladas de cetáceos encalhados no litoral do Ceará, todas eram *Candida* não-*albicans*, sendo *C. tropicalis* a espécie mais abundante. Esse achado reforça outros estudos que mostram que *C. albicans* não aparenta ser a levedura com maior potencial de colonização em cetáceos de vida livre, o contrário do que é observado em animais mantidos em cativeiro (HIGGINS, 2000, REIDARSON et al., 2001; BUCK et al., 2006, MORRIS et al., 2011). Um filhote de *K. sima* mantido durante um mês em reabilitação teve quatro cepas de *C. tropicalis* recuperadas a partir das suas cavidades naturais após sofrer um traumatismo abdominal severo, que culminou com o óbito. Sugere-se que uma candidemia estivesse em curso, porém estudos moleculares são necessários para comprovar que se tratava de cepas relacionadas filogeneticamente.

Um isolado da alga aclorofílica *Prothotheca* sp. foi obtido a partir da cultura de swab retal de um espécime de *K. sima*. Aparentemente, trata-se do primeiro registro de colonização por esse agente em mamíferos aquáticos. Nenhuma lesão detectada na necropsia nem alterações em exames complementares realizados posteriormente foram atribuídas a esse agente. O gênero *Prototheca* é formado por algas ubíquas, presentes no solo, vegetação, água, ambientes marinhos, humanos, animais domésticos e selvagens. Duas espécies tem maior destaque nos raros casos raros de infecção, *P. wickerhamii* e *P. zopfii* (PFALLER & DIEKEMA, 2005). A identificação em nível de espécie não foi realizada no único isolado desse estudo devido à inconsistência nos resultados dos testes diferenciais de assimilação de carboidratos e nitratos. Na medicina veterinária é relatada principalmente em casos de mastite bovina e também em infecções profundas, havendo relato de meningoencefalite em cão causada por essa alga (AMORIM et al., 2010; MARQUEZ et al., 2012).

Dentre as nove cepas de *Candida* spp. avaliadas quanto ao perfil de sensibilidade antifúngica, apenas dois isolados de *C. tropicalis*, obtidos a partir de um espécime de *K. sima*, apresentaram resistência aos dois derivados azólicos testados. O animal não foi levado para cativeiro e sobreviveu poucas horas após o resgate, o que sugere que a colonização ocorreu no ambiente natural. Aparentemente não há relatos publicados sobre a detecção de leveduras resistentes aos antifúngicos em mamíferos aquáticos de vida livre. *C. tropicalis* resistentes já foram detectadas em golfinhos-nariz-de-garrafa cativos (TAKAHASHI et al., 2010). Esse achado reforça o potencial do monitoramento dos níveis de resistência antimicrobiana em

microrganismos isolados de animais selvagens como ferramenta para avaliação da contaminação ambiental.

Com relação aos fatores de virulência pesquisados, um maior percentual de produção de fosfolipases e capacidade de formação de biofilme foi verificado em *Candida* spp. de cetáceos do que de sirênios. A produção de proteases foi equivalente nos dois grupos. *C. tropicalis* isoladas de cetáceos se mostraram mais virulentas do que aquelas obtidas de sirênios. Nesses casos, o isolamento de microrganismos se deu a partir de animais doentes, com quadros de saúde graves, sugerindo que expressam uma maior produção de fatores de virulência em hospedeiros imunocomprometidos.

A baixa taxa de isolamento de leveduras de botos-vermelhos corrobora com achados de pesquisas realizadas com outros cetáceos de vida livre, como golfinhos-nariz-de-garrafa. Buck et al (2006) pesquisaram microrganismos aeróbios de 245 *T. truncatus* nos estados americanos da Flórida, Texas e Carolina do Norte entre os anos 1990 e 2002 e obtiveram uma prevalência de 6,3% para leveduras, sendo *C. tropicalis* e *C. albicans* as espécies mais frequentes. Em estudo similar, Morris et al., (2011) observaram uma prevalência 8,3% de fungos dentre microrganismos aeróbios isolados de 180 *T. truncatus* na costa Atlântica dos Estados Unidos de 2003 a 2005, sendo *C. glabrata* e *C. tropicalis* as espécies mais abundantes. Paralelamente a pesquisa de leveduras, foi realizado o isolamento de bactérias Gram-negativas dos 13 botos-vermelhos, dos quais foram obtidos mais de 75 cepas a partir dos mesmos sítios anatômicos. A prevalência de leveduras nessa pesquisa foi de 6,1% (5/82), mas está superestimada, visto que bactérias Gram-positivas não foram isoladas. Dentre os cinco isolados, três pertenciam ao gênero *Cryptococcus* sp., achado incomum dentre os levantamentos de microbiota leveduriforme de veterbrados citados anteriormente.

O contato intenso e frequente da população de botos-vermelhos estudada com seres humanos, principalmente turistas provenientes de diversas regiões do Brasil e outros países, pode representar um risco à saúde dos animais e das pessoas. Diversos microrganismos isolados de mamíferos aquáticos apresentam reconhecido potencial zoonótico (BOSSART, 2010). A transmissão de microrganismos pode se dar pela inalação do ar exalado dos botos, pelo contato com a pele e através de mordidas provocadas acidentalmente durante as tentativas de alimentação dos animais. As conexões estabelecidas entre os seres humanos e a população de botos utilizada para ecoturismo na Reserva do rio Negro promovem um fluxo de microrganismos entre esses distintos taxa e podem favorecer a ocorrência de doenças

infecciosas em ambos os organismos. O levantamento da microbiota de um maior número de botos, de áreas geográficas distintas, pode revelar diferenças populacionais e influência das atividades antrópicas sobre as comunidades microbianas desses animais, bem como a real importância destes como agentes oportunistas.

No tocante as doenças fúngicas, os diagnósticos de três micoses cutâneas superficiais foram obtidos em sirênios nesse estudo: um caso de levedurose mista por *T. asahii* e *C. tropicalis* em peixe-boi-da-Amazônia, um caso de feohifomicose por *B. hawaiiensis* em peixe-boi-marinho e um surto de fusariose por *Fusarium* sp. em peixes-bois-marinho. Todas as doenças apresentaram bom prognóstico e houve evolução para a cura em todos os casos. Doenças fúngicas são raramente diagnosticadas em sirênios, restritas a dermatites causadas por cinco gêneros de fungos (FORRESTER, 1992; BOSSART, 2001).

Todos os animais afetados eram filhotes, com idades variando de 20 dias a 11 meses na ocasião do diagnóstico. Bledsoe et al. (2006) sugeriram que as defesas da epiderme de peixes-bois-da-Flórida não funcionam efetivamente como em outros grupos de mamíferos aquáticos, visto que são comumente colonizados por algas e invertebrados. Dessa forma, a deficiência imunológica da pele, as mudas naturais que ocorrem nessa faixa etária e a imaturidade do sistema imunológico podem ser fatores predisponentes à infecções fúngicas oportunistas em peixes-bois.

Lesões de pele suspeitas de etiologia fúngica, com aspecto similar aquelas causadas por *C. tropicalis* e *T. asahii*, são comumente observadas em peixes-bois-da-Amazônia mantidos em cativeiro no CPPMA. Filhotes são os principais animais afetados, principalmente durante as fases de muda de pele. A manutenção dos animais nos primeiros meses de vida em área de berçário coberta, sem exposição ao sol, parece ser um fator predisponente a persistência dessas lesões, visto que a regressão ocorre espontaneamente após a transferência dos filhotes doentes para recintos abertos, sem necessidade de tratamento com antifúngicos (Stella Lazzarini, comunicação pessoal).

O isolamento das duas espécies de leveduras da mesma lesão sugere uma infecção mista, não sendo possível atribuir o quadro clínico a uma espécie separadamente. A infecção não apresentou caráter contagioso, visto que o animal afetado compartilhava o recinto com outro filhote, que apresentava pele íntegra. Os banhos diários com solução de clorexidine também podem representar um fator predisponente, visto que há constante eliminação de parte da

microbiota cutânea, que possui importante papel na imunidade da pele (SANFORD & GALLO, 2013)

Dentre as leveduras do gênero *Candida*, *C. tropicalis* é um dos agentes mais comumente envolvidos em candidemias em pacientes imunocomprometidos, principalmente em infecções nosocomiais (NEGRI et al., 2012). Também é um patógeno reportado em infecções em animais, bem como constitui a microbiota de diversos vertebrados (SILVA et al. 2012), incluindo mamíferos aquáticos, como golfinhos-nariz-de-garrafa (TAKAHASHI et al., 2010). *T. asahii* é reportado como um dos agentes de uma micose superficial estrita em humanos, a piedra branca, e também causando infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos (SIDRIM & ROCHA, 2004). Nesse estudo houve isolamento de *C. tropicalis* e *T. asahii* da microbiota de peixes-bois-da-Amazônia. O diagnóstico de infecção cutânea por essas leveduras demonstra o potencial destas como agentes de infecções oportunistas em sirênios.

O diagnóstico de infecção por *B. hawaiiensis* em peixe-boi-marinho consistiu no primeiro relato de feohifomicose em mamíferos aquáticos. Diversas espécies de fungos demáceos já foram isoladas a partir de distintas taxa de animais, no entanto, as feohifomicoses causadas por *Bipolaris* sp., como a diagnosticada nesse trabalho, são raras em medicina veterinária (GIRI et al., 2011). O gênero *Bipolaris* sp. contém mais de 100 espécies, descritas principalmente como fitopatógenos ou associadas ao solo e alimentos em decomposição, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (BASHIR et al. 2009; GIRI et al. 2011, DA CUNHA et al. 2012). Três destas possuem maior importância médica como agentes de feohifomicoses superficiais, subcutâneas e profundas, *B. spicifera*, *B. australiensis* e *B. hawaiiensis* (MC GINNIS et al.,1986; PERFECT et al., 2011).

Dentre os poucos relatos de feohifomicoses causadas por *Bipolaris* sp. em animais, a maioria é atribuída a *B. spicifera*, acometendo cavalos, vacas, gatos e cães. No entanto, grande parte dos casos data da década de 70 e foram atribuídos erroneamente aos gêneros *Drechslera* sp. e *Helminthosporium* sp. (DE HOOG et al. 2000). Há registro de um caso fatal de feohifomicose sistêmica por *B. spicifera* em cão, com comprometimento do sistema nervoso central e rins (GIRI et al. 2011). Não foram encontrados casos de infecções por *B. hawaiiensis* em animais na literatura, sendo este primeiro registro de feohifomicose por este agente em medicina veterinária. No Brasil existe apenas um relato de caso publicado de infecção por *B. hawaiiensis*, descrito em um trabalhador rural na região sudeste do país (COSTA et al. 1991).

A inoculação traumática na pele é a principal forma de transmissão de feohifomicoses cutâneas (COSTA et al. 1991; GIRI et al. 2011). No caso em estudo, não foi possível determinar a forma de transmissão, no entanto, acredita-se que a vegetação no entorno dos tanques pode representar a fonte de infecção, visto que *Bipolaris* sp. é encontrado como saprófita de plantas e solo (BASHIR et al. 2009). Esponjas utilizadas para dar banho no animal, com debridação, podem ter provocado abrasões, que podem ter permitido entrada do agente. A utilização profilática de solução de clorexidine semanalmente para antissepsia da pele pode ter favorecido a infecção devido à eliminação temporária da microbiota local.

O tratamento com itraconazol na dosagem recomendada por Bossart (2001) se mostrou eficaz, sem efeitos deletérios graves sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos do filhote de peixe-boi-marinho. A duplicação dos níveis séricos de ALT e AST possivelmente foi causada pelo uso do antifúngico, visto que os derivados azólicos podem elevar de 2 a 25 vezes os níveis séricos de enzimas hepáticas em mamíferos marinhos, porém raramente provocam doenças hepáticas nesses animais (REIDARSON et al. 2001). Além de sua ampla utilização na medicina veterinária, o itraconazol tem atividade potente e consistente para o tratamento de feohifomicoses, inclusive nas formas sistêmicas (REVANKAR et al. 2002).

A detecção de um surto de fusariose em peixes-bois-marinhos mantidos no CRMM/AQUASIS representa um raro registro de doença fúngica de caráter epidêmico em mamíferos aquáticos, visto que os fungos são agentes pouco transmissíveis entre esses animais (REIDARSON et al., 2001). Existe apenas um caso publicado de dermatite causada por *Fusarium* sp. em *T. manatus*, provocando lesões pustulares (FORRESTER, 1992). Em cetáceos, relatos de fusariose cutânea e profunda já foram descritos em animais encalhados e mantidos em cativeiro (STAGGS, 2010; NAPLES et al., 2012).

O gênero *Fusarium* é composto por mais de 100 espécies, largamente distribuídas no solo, água, plantas e diversos substratos orgânicos. Três espécies possuem maior importância médica, *F. solani*, *F. oxysporum* e *F. verticillioides*, porém outras podem envolvidas em infecções humanas, causando principalmente ceratomicoses e infecções disseminadas (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2008; AZOR et al., 2009). A determinação da espécie de *Fusarium* sp. envolvida na etiologia dos casos em peixes-bois não foi conclusiva, visto que foi realizada apenas a identificação fenotípica. A identificação com base na morfologia tem sido limitada, visto que muitas espécies envolvidas em infecções humanas são difíceis de serem

distinguidas. Dessa forma, métodos moleculares têm sido empregados com mais rapidez e precisão na identificação (AZOR et al., 2009).

O aspecto das lesões descrito nos oito filhotes de peixe-boi-marinho acometidos difere dos quadros cutâneos nodulares relatados em outras espécies de mamíferos aquáticos. Nenhum dos animais apresentou sinais de prurido, inapetência ou alterações hematológicas. Desde a ocorrência do caso de feohifomicose em um dos filhotes mantidos no CRMM, suspendeu-se a realização de banhos com solução de clorexidine após os manejos biomédicos por ser um fator predisponente a infecções cutâneas. Apesar de todos os recintos possuírem sistema de tratamento independente, a fonte de abastecimento de água é comum, representando uma possível fonte de infecção. As arranhaduras e lacerações superficiais que ocorreram na pele dos animais durante a captura com rede para realização de manejo biomédico podem favorecer a penetração e instalação do fungo. A fusariose observada em peixes-bois apresentou caráter contagioso, visto que animais adoeceram simultaneamente ou contraíram a infecção após serem acondicionados em recintos com outros em fase final de tratamento ou de regressão das lesões.

Fusarium spp. são resistentes *in vitro* a muitos compostos antifúngicos, sendo *F. solani* considerada espécie mais resistente (PUJOL et al., 1997; ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2008). As recidivas observadas em dois animais, com necessidade de tratamentos prolongados, podem ter ocorrido por subdosagem de itraconazol no caso do filhote 02S0111/63 e/ou por resistência dos isolados, porém a sensibilidade *in vitro* não foi investigada. A persistência do fungo em água salgada, clorada e filtrada durante cerca de um ano nos tanques do CRMM, indica a resistência desses isolados ao sistema de tratamento de água empregado, sendo necessário investigar a utilização de outros métodos associados, como ozônio e radiação ultravioleta.

O diagnóstico de feohifomicose e fusariose em peixes-bois-marinhos amplia o espectro de doenças fúngicas que acometem esses animais. A presença de fungos em animais cativos, mantidos em recintos com qualidade de água adequada e sob boas condições de manejo, demonstra a susceptibilidade desses animais a doenças infecciosas em ambientes artificiais.

Por fim, outro aspecto abordado nesse estudo foi a diversidade genética de leveduras da espécie *C. albicans* isoladas a partir de mamíferos aquáticos. O banco de dados mundial de MLST possuía informações mapeadas de 2194 isolados de *C. albicans* até 20/06/2015. Destes, apenas 139 são provenientes da América do Sul, incluindo 80 cepas do Brasil. Os dados cadastrados nesse estudo representam 58,75% (47/80) das informações disponíveis no país e

um dos poucos trabalhos realizados com cepas de origem animal no mundo. As informações provenientes da tipagem molecular por MLST são uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos, de filogenia e para distinção intraespecífica de bactérias e fungos (DA MATTA, 2009).

Foram avaliados os isolados de duas espécies de sirênios mantidos em cativeiro em duas cidades distintas: peixes-bois-da-Amazônia provenientes de Balbina, Amazonas, e peixes-bois-marinheiros da Ilha de Itamaracá, Pernambuco. Apesar dos animais terem sido resgatados em diversos municípios e localidades das regiões norte e nordeste do país, a maioria foi para cativeiro quando neonatos ou filhotes, reduzindo o potencial de colonização por leveduras provenientes do ambiente natural. No entanto, acredita-se algumas podem ser carreadas e persistir no ambiente artificial.

Apesar de terem sido encontradas 27 novas DSTs nesse estudo, apenas um novo genótipo foi cadastrado, o de número 243 para o gene ZWF1. A medida que aumenta o número de isolados sequenciados, as chances de novos genótipos serem encontrados vão diminuindo, havendo principalmente novas combinações de genótipos que dão origem a novas DSTs (DA MATTA, 2009; ODDS, 2010). Dentre as DSTs detectadas nesse estudo, 81,8% eram novas, sugerindo que pode haver particularidades genéticas nesses isolados no Brasil e América do Sul (DA MATTA, 2009)

As duas espécies de peixe-boi avaliadas compartilharam cepas pertencentes ao clado 8. No entanto, isolados dos cladros 9 e 11 foram exclusivos de *T. inunguis*, enquanto aqueles dos cladros 1 e 17 foram encontrados somente em *T. manatus*. Esse achado sugere uma origem evolutiva diferente de alguns microrganismos que colonizam as duas espécies de peixes-bois, visto que possuem habitats distintos e que os indivíduos avaliados encontravam-se distantes geograficamente, o que favorece a colonização por cepas adaptadas as condições de cada local.

Os poucos estudos realizados com cepas de origem animal apontam para uma direção evolutiva distinta das cepas humanas, indicando que 73% dos isolados de origem animal tipados pertenciam aos cladros 3, 8, 10 e 16, diferentemente do que é observado para isolados humanos, que se concentram nos cladros 1, 2, 3 e 4 (JACOBSEN et al., 2008a; WROBBEL et al., 2008; ODDS, 2010; ANGEBAULT et al., 2013). Nesse estudo, as cepas do clado 8 representaram 60% (27/45) dos isolados, corroborando com os resultados conhecidos para cepas de animais selvagens e com banco de dados mundial, que aponta a América do Sul como o continente mais representativo desse clado (JACOBSEN et al., 2008a; WROBBEL et al., 2008). A maioria dos

isolados que apresentou relação com cepas humanas estava classificada no clado 8. Adicionalmente, um isolado humano (H2), pertencente também ao clado 8, apresentou relação com seis cepas de peixes-bois-da-Amazônia. Sabe-se que não há relação estrita entre tipos de cepas e hospedeiros. Esses achados reforçam que a transmissão de *C. albicans* ocorre preferencialmente de humanos para animais (ODDS, 2010). O outro isolado humano (H1) pertencia ao clado 16, sem relação com as cepas dos animais. Vale ressaltar que o contato desse profissional com os peixes-bois era bem mais limitado do que o outro tratador, que há mais de dez anos era responsável exclusivamente pelo aleitamento de filhotes, atividade na qual há contato diário e frequente com os animais.

Cepas pertencentes aos cladros 11 e 17 também foram representativas nessa amostragem, com todas possuindo novas DSTs. O clado 11 inclui principalmente isolados de infecções superficiais e disseminadas na Europa e, em maior número, no Reino Unido, enquanto o clado 17 está representado em sua maioria na Ásia (ODDS et al., 2007; MCMANNUS & COLEMAN, 2014). O clado 9, onde duas cepas foram incluídas nesse estudo, ainda é um dos menos conhecidos (ODDS et al., 2007). Um maior número de isolados provenientes desses cladros deve ser analisado para que seja possível estabelecer relações epidemiológicas e filogenéticas mais robustas.

Uma significativa proporção de isolados associados a infecções superficiais e cepas comensais estão classificadas no clado 1, que foi pouco representativo nesse estudo, correspondendo a 2,2% (1/45) dos isolados. Essas cepas são mais adaptadas e apresentam uma distribuição global. Na América do Sul, este clado corresponde a 44% dos isolados. (ODDS et al., 2007; ODDS, 2010).

Todas as DSTs de isolados de *T. manatus* foram novas e apenas uma cepa (580) apresentou relação filogenética com outra (ID 662) cadastrada no banco de dados mundial de MLST de *C. albicans*, sendo esta proveniente de escarro de origem humana da cidade de Recife. Considerando que o espécime de peixe-boi-marinho hospedeiro colonizado por essa cepa era mantido nas instalações do CMA, na Ilha de Itamaracá, também no estado de Pernambuco, sugere-se que a origem dos isolados seja comum.

Quatorze isolados de *C. albicans* de *T. inunguis* apresentaram relação filogenética com cepas de origem humana provenientes do Brasil e outros países (Quadro 3). Dez isolados estavam relacionados a cepas obtidas das fezes de populações indígenas da Guiana Francesa, sugerindo um ancestral comum em *C. albicans* na região Amazônica. Oito isolados

apresentaram relação com cepas clínicas de pacientes humanos de diversos países, como França, Bélgica, Irlanda, Estados Unidos, Austrália, Malásia, Hong Kong, Japão e África do Sul, demonstrando o potencial de disseminação de *C. albicans* em vários continentes. Nesse contexto destaca-se uma cepa de *T. inunguis* (90O) que apresentou uma das DSTs (918) com maior frequência de ocorrência no mundo. A ausência de barreiras geográficas e trânsito de pessoas entre os diversos países favorece a disseminação de cepas mais adaptadas (ODDS,2010). A similaridade de alguns isolados com cepas clínicas, isoladas inclusive de pacientes com candidemia, alerta para a possibilidade de infecção oportunista em peixes-bois com comprometimento da imunidade.

A maioria das pessoas carrega tipos de cepas indistinguíveis ou similares num sítio anatômico, numa mesma localidade geográfica (BOUGNOUX et al., 2006; ODDS et al., 2006). Isolados de uma mesma fonte pertencentes a diferentes clados, mais do que cepas de tipos diferentes, são evidência robustas de substituição de cepas. Um peixe-boi-da-Amazônia apresentou isolados (49O1 e 49G1) da cavidade oral e abertura genital pertencentes a dois clado distintos, sugerindo que houve substituição de cepas. No entanto, uma pequena proporção de indivíduos carrega mais de um tipo de cepa de *C.albicans* num mesmo sítio anatômico, indicando que nem sempre essa substituição é de origem exógena (JACOBSEN et al., 2008b). A demonstração de um mesmo tipo de cepa colonizando um grupo de indivíduos próximos sugere transmissão direta (ODDS, 2010). Nesse estudo foi constatada a presença de quatro isolados de animais distintos, mantidos num mesmo recinto, com a mesma DST (1029). Outras DSTs (90, 461, 2211 e 2216) foram compartilhadas entre isolados de peixes-bois diferentes, porém mantidos em recintos separados. Esses achados podem ser explicados pela mudança de recintos que os animais passam ao longo do processo de reabilitação, havendo convívio em algum momento com espécimes que não estavam juntos no momento da amostragem. Além disso, o contato com seres humanos e fômites podem ser fontes de contaminação.

Com relação aos dados de sensibilidade antifúngica, houve isolados resistentes aos derivados azólicos em todos os clados, com maior percentual entre as cepas dos clados 11 (80%) e 8 (58,2%). ODDS et al. (2007) observaram uma maior prevalência de cepas com susceptibilidade reduzida aos derivados azólicos nos clados 5 e 6, porém sem significância estatística. Uma correlação estatística entre tipo de cepa e sensibilidade antifúngica foi encontrada apenas com as drogas flucitosina e terbinafina. Apesar da terbinafina não ser utilizada no tratamento de infecções por *Candida*, uma maior resistência a essas droga foi

encontrada nos isolados do clado 1 e, em menor extensão, no clado 3 (ODDS, 2009). Estas associações altamente significativas entre o tipo de cepa e a sensibilidade a flucitosina e terbinafina enfatizam como as diferenças entre clados nem sempre se extrapolam para os ambientes ou prática clínica (ODDS, 2010).

8. CONCLUSÃO

A mucosa das cavidades naturais da maioria das espécies de mamíferos aquáticos avaliadas nesse estudo se mostrou colonizada por leveduras de diversas espécies, sendo grande parte destas reconhecida como microrganismos comensais e/ou agentes oportunistas de micoses superficiais e disseminadas.

A avaliação de um maior número de espécimes de sirênios mantidos em cativeiro possibilitou a caracterização da microbiota por leveduras desses animais e revelou a forte influência das condições artificiais do ambiente cativo sobre a constituição das comunidades microbianas, tendo em vista a elevada prevalência de *C. albicans* e outras leveduras de importância clínica.

Com relação aos isolados de cetáceos encalhados e de vida livre, a prevalência de leveduras na microbiota foi baixa, sugerindo que fatores ambientais exercem uma maior pressão seletiva sobre esses microrganismos do que em cativeiro, onde há maior associação com seres humanos.

A sensibilidade antifúngica das leveduras do gênero *Candida* isoladas de sirênios e cetáceos revelou elevadas taxas de resistência aos derivados azólicos itraconazol e fluconazol, principalmente nas espécies *C. albicans* e *C. tropicalis*. A produção de fatores de virulência por essas cepas, principalmente de enzimas hidrolíticas, alerta para o potencial patogênico desses microrganismos em mamíferos aquáticos.

As doenças fúngicas apresentaram baixa prevalência nos animais pesquisados, no entanto a melhoria nos diagnósticos se faz necessária para que não sejam subnotificadas. Os casos de micoses superficiais apresentaram boa evolução e resposta aos tratamentos empregados. A presença de agentes fúngicos em animais cativos, mantidos sob boas condições de manejo e de qualidade de água, demonstra a susceptibilidade desses animais aos microrganismos oportunistas no ambiente artificial.

A tipagem molecular das cepas de *C. albicans* isoladas de sirênios revelou dados epidemiológicos, formas de transmissão e persistência desses microrganismos nos animais, indicando claramente a forte influência das condições artificiais e contato com seres humanos sobre a saúde de sirênios mantidos em cativeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO, W.; KAWACHI, T.; SAKAI, H.; FUKUSHI, H.; KANO, R.; SHIBAHARA, T.; SHIROUZU, H.; KAKIZOE, Y.; TUJI, H.; YANAI, T. Disseminated mycosis in a killer whale (*Orcinus orca*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.24, n.1, p.211-218, 2012.

ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; ROCHA-GOSSELIN, A.; GENDRON, D. A novel non-invasive tool for disease surveillance of free-ranging whales and its relevance to conservation programs. *Animal Conservation*, v.13, n.2, p.217-225, 2010.

AHMAD, S.; KHAN, Z.; ASADZADEH, M.; THEYYATHEL, A.; CHANDY, R. Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *BMC Infect Dis.*, v.12, p.230, 2012.

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MONZÓN, A.; MELLADO, E.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 61, n.4, p.805-809, 2008.

AMORIM, R. N. L.; DE SOUZA, A. O. G.; LIMA, P. M.; BEZERRA, F. S. B.; ALVES, N. D.; FEIJÓ, F. M. C. Mastite clínica em bovino causada por *Prototheca zopfii* no estado do Ceará. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.4, n.4, p.307-311, 2011.

ANGEBAULT, C.; DJOSSOU, F.; ABÉLANET, S.; PERMAL, E.; SOLTANA, M. B.; DIANCOURT, L.; BOUCHIER, C.; WOERTHER, P. L.; CATZEFLIS, F.; ANDREMONT, A.; D'ENFERT, C.; BOUGNOUX, M. E. *Candida albicans* is not always the preferential yeast colonising humans: a study amongst Wayampi Amerindians. *Journal of Infectious Diseases*, jit389, 2013.

APPRILL, A.; ROBBINS, J.; EREN, A. M.; PACK, A. A.; REVEILLAUD, J.; MATTILA, D.; MOORE, M.; NIEMEYER, M.; MOORE, K. M. T.; MINCER, T. J. Humpback whale

populations share a core skin bacterial community: towards a health index for marine mammals?. *PloS one*, v.9, n.3, e90785, 2014.

ARENDRUP, M. C. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clinical Microbiology and Infection*, v.20, n.s6, p.42-48, 2013

ARKUSH, K. D. Water quality. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. (Eds). Handbook of Marine Mammal Medicine. Boca Raton: CRC Press, 2001, pp. 779-790, 2001.

ATTADEMO, F. L. N. Detecção da infecção de rotavírus, coronavírus, enterobactérias, *Leptospira* spp., *Brucella abortus* e *Toxoplasma gondii* em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) em cativeiro no Brasil. 2014. 142f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014

AVALOS-TÉLLEZ, R.; SUÁREZ-GÜEMES, F.; CARRILLO-CASAS, E. M.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R. 2010. Bacteria and yeast normal microbiota from respiratory tract and genital area of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). In: MENDÉZ-VILAS, A. (Ed). *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, vol 1, Badajoz: Formatex, p. 666-673.

AZOR, M.; GENÉ, J.; CANO, J.; MANIKANDAN, P.; VENKATAPATHY, N.; GUARRO, J. Less-frequent *Fusarium* species of clinical interest: correlation between morphological and molecular identification and antifungal susceptibility. *Journal of clinical microbiology*, v.47, n.5, p.1463-1468, 2009.

BAI, F. Y. Association of genotypes with infection types and antifungal susceptibilities in *Candida albicans* as revealed by recent molecular typing strategies. *Mycology*, v.5, n.1, p.1-9, 2014.

BASHIR, G.; HUSSAIN, W.; RIZVI, A. *Bipolaris hawaiiensis* Keratomycosis and Endophthalmitis. *Mycopathologia*, v.167, p.51-53, 2009.

BEN-AMI, R.; OLSHTAIN-POPS, K.; KRIEGER, M.; OREN, I.; BISHARA, J.; DAN, M.; WIENER-WELLG, Y.; WEINBERGERH, M.; ZIMHONYI, O.; CHOWERSJ, M.; WEBERK, G.; POTASMANL, I.; CHAZANM, B.; KASSISD, I.; SHALITE, I.; BLOCKB, C.; KELLERC, N.; KONTOYIANNISN, D. P.; GILADI, M. Antibiotic exposure as a risk factor for fluconazole-resistant *Candida* bloodstream infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v.56, n.5, p.2518-2523, 2012

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev*, v.70, p.567–590, 1990.

BERMUDEZ, L.; VAN BRESSEM, M. F.; REYES-JAIMES, O.; SAYEGH, A. J.; PANIZ-MONDOLFI, A. E. Lobomycosis in man and lobomycosis-like-disease in bottlenose dolphin, Venezuela. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, p.1301-1303, 2009.

BERTA, A.; SUMICH, J. L.; KOVACS, K. M. Marine mammals: evolutionary biology. Second Edition, San Diego: Academic Press, 2006, p.569.

BEST, P. B.; MC CULLY, R. M. Zygomycosis (phycomycosis) in a right whale (*Eubalaena australis*). *Journal of comparative pathology*, v.89, n.3, p.341-348, 1979.

BLEDSON, E. L.; HARR, K. E.; CICHRA, M. F.; BONDE, R. K.; LOWE, M. A comparison of biofouling communities associated with free-ranging and captive Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). *Marine Mammal Science*, v.22, n.4, p.997-1003, 2006.

BOGOMOLNI, A. L.; GAST, R. J.; ELLIS, J. C.; DENNETT, M.; PUGLIARES, K. R.; LENTELL, B. J.; MOOREM, J. Victims or vectors: a survey of vertebrate zoonoses from coastal waters of the Northwest Atlantic. *Dis Aquat Org*, v.8, n.1, p.13–38, 2008.

BONDE, R. K.; AGUIRRE, A. A.; POWELL, J. Manatees as Sentinels of Marine Ecosystem Health: Are They the 2000-pound Canaries? *Ecohealth*, v.1, p.255-262, 2004.

BONDE, R. K.; GARRETT, A.; BELANGER, M.; ASKIN, N.; TAN, L.; WITTNICH, C. Biomedical health assessments of the Florida manatee in Crystal River-providing opportunities for training during the capture, handling, and processing of this endangered aquatic mammal, *Journal of Marine Animals and Their Ecology*, v.5, n.2. p.17-28, 2012.

BOSSART, G. D. Manatee. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. (Eds). *Handbook of Marine Mammal Medicine*. Boca Raton: CRC Press, 2001, pp. 939-960.

BOSSART, G. D.; MEISNER, R. A.; ROMMEL, S. A.; LIGHTSEY, J. D.; VARELA, R. A.; DEFRAN, R. H. Pathologic findings in Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). *Aquatic Mammals*, v.30, p.434-440, 2004.

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

BOSSART, G. Emerging diseases in marine mammals: from dolphins to manatees. *Microbe*, v.2, n.11, p.544-549, 2007.

BOSSART, G. D. Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health. *Vet Pathol*, v.48, p.676-690, 2011.

BOUGNOUX, M. E.; MORAND, S.; D'ENFERT, C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* v.40, p.1290–1297, 2002.

BOUGNOUX, M. E.; TAVANTI, A.; BOUCHIER, C.; GOW, N. A.; MAGNIER, A.; DAVIDSON, A. D.; MAIDEN, M. C.; D'ENFERT, C.; ODDS, F. C. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, v.41, p. 5265-5266, 2003.

BOUGNOUX, M. E.; DIOGO, D.; FRANCOIS, N.; SENDID, B.; VEIRMEIRE, S.; COLOMBEL, J. F.; BOUCHIER, C.; VAN KRUIJNINGEN, H.; D'ENFERT, C; POULAIN,

D. (2006). Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of *Candida albicans* isolates from the human digestive tract. *Journal of clinical microbiology*, v. 44, n.5, 1810-1820, 2006.

BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO BRANCO, D. C. S.; SOARES, G. D.; MONTEIRO, A. J.;CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Characterization of the gastrointestinal yeast microbiota of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): a potential hazard to human health. *Journal of Medical Microbiology*, v.59, n.6, p.718-723, 2010.

BRILHANTE, R.S.; PAIVA, M.A.N.; SAMPAIO, C.M.S.; TEIXEIRA, C.E.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; LEITE, J.J.G.; MOREIRA, C.A.; SILVA, L.P.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Yeasts from *Macrobrachiumamazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. *FEMS MicrobiologyEcology*, v.76, p.268 – 277, 2011.

BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; DUARTE, G. P. S.; PAIVA, M. A. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; ZEFERINO, J. P. O.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Yeast microbiota of raptors: a possible tool for environmental monitoring. *Env Microbiol Rep*, v.1, p.189-193, 2012.

BRILHANTE, R. S. N.; DE ALENCAR, L. P.; DE AGUIAR CORDEIRO, R.; CASTELO, D. D. S. C. M.; TEIXEIRA, C. E. C.; MACEDO, R. B.; LIMA, D. T.; PAIVA, M. A. N.; MONTEIRO, A. J.; ALVES, N. D.; DE OLIVEIRA, M. F.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; BANDEIRA, T. J. P. G.; RODRIGUES, T. D. J. S. (2013). Detection of *Candida* species resistant to azoles in the microbiota of rheas (*Rhea americana*): possible implications for human and animal health. *Journal of medical microbiology*, v.62, n.6, p.889-895, 2013.

BRITO, E. H.; FONTENELLE, R. O.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *The veterinary journal*, v.182, n.2, p.320-326, 2009.

BUCK, J. D. Occurrence of human-associated yeasts in the feces and pool waters of captive bottlenosed dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, v.16, p.141-149, 1980.

BUCK, J. D.; WELLS, R. S.; RHINEHART, H. L.; HANSEN, L. J. Aerobic microorganisms associated with free-ranging bottlenose dolphins in coastal Gulf of Mexico and Atlantic Ocean Waters. *J Wildlife Dis*, v.42, p.536-544, 2006.

BUREK, K. A.; GULLAND, F. M. D.; O'HARA, T. M. Effects of climate change on arctic marine mammal health. *Ecological applications*, v.18, n.2, p.126-134, 2008.

BUTINAR, L.; SANTOS, S.; SPENCER-MARTINS, I.; OREAN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett*, v.244, p.229-234, 2005

CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M. A. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; CAETANO, E. P.; RIBEIRO, J. F.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G.. Azole-resistant *Candida albicans* from a wild Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*): a sign of an environmental imbalance? *Medical mycology*, v.51, n.5, p.555-560, 2013.

CATES, M. B.; KAUFMAN, L.; GRABAU, J. H.; PLETCHER, J. M.; SCHROEDER, J. P. Blastomycosis in an Atlantic bottlenose dolphin. *J Am Vet Med Assoc*, v.189, p.1148-1150, 1986.

CLSI, 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3.

CONSORTIUM HMP. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, v.486,n.7402, 207-214, 2012.

COSTA, A. R.; PORTO, E.; TABUTI, A. H.; LACAZ, C. Z.; SAKAI-VALENTE, N. Y.; MARANHÃO, W. M.; RODRIGUES, M. C. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Bipolaris hawaiiensis*: case report. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.33, n.1, p.74-79, 1991.

COWAN, D. F.; HOUSE, C.; HOUSE, J. A. Public Health. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. (Eds). *Handbook of Marine Mammal Medicine*. Boca Raton: CRC Press, 2001, p.767-778.

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

D’AFFONSECA NETO, J. A. ; VERGARA-PARENTE, J. E. Sirenia (Peixe-boi Marinho e Amazônico). In: CUBAS, Z. S.; DA SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Orgs.). *Tratado de Animais Selvagens*. Primeira edição. São Paulo: Editora Roca, 2006.

DAGLEISH, M. P.; PATTERSON, I. A. P.; FOSTER, G.; REID, R. J.; LINTON, C.; BUXTON, D. Intracranial granuloma caused by asporogenic *Aspergillus fumigatus* in a harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *Veterinary record*, v.159, n.14, 458, 2006.

DAGLEISH, M. P.; FOSTER, G.; HOWIE, F. E.; REID, R. J.; BARLEY, J. Fatal mycotic encephalitis caused by *Aspergillus fumigatus* in a northern bottlenose whale (*Hyperoodon ampullatus*). *The Veterinary Record*, v.163, p.602-604, 2008.

DA CUNHA, K. C.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; CANO, J.; GENÉ, J.; MADRID, H.; DE HOOG, S.; CROUS, P. W.; GUARRO, J. Diversity of *Bipolaris* Species in Clinical Samples in the United States and Their Antifungal Susceptibility Profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, v.50, n.12, p.4061–406, 2012.

DA MATTA, D. A. Caracterização de isolados clínicos de *Candida albicans* de estudo brasileiro multicêntrico de candidemia por metodologia de “Multilocus Sequence Typing (MLST)”. 2009. 96f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

DA SILVA, V. M. F.; MARTIN, A. R.. A study of the boto, or Amazon river dolphin (*Inia geoffrensis*), in the Mamirauá Reserve, Brazil: operation and techniques. Biology and

conservation of freshwater cetaceans in Asia. *Occasional paper of the IUCN Species Survival Commission*, v. 23, p.121-131, 2000.

DEEM, S. L.; KARESH, W. B.; WEISMAN, W. Putting theory into practice: wildlife health in conservation. *Conservation biology*, v.15, n.5, p.1224-1233, 2001.

DELANEY, M. A.; TERIO, K. A.; COLEGROVE, K. M.; BRIGGS, M. B.; KINSEL, M. J. Occlusive Fungal Tracheitis in 4 Captive Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). *Veterinary Pathology Online*, v.50, n.1, p.172-176, 2013.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. *Atlas of Clinical Fungi. Vol. 2* Second Edition. Washington: American Society for Microbiology, p. 1126, 2000.

DE VRIES, G. A.; LAARMAN, J. J. A case of Lobo's disease in the dolphin *Sotalia guianensis*. *Aquat Mamm*, v.1, p.26-29, 1973.

DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. *Handbook of Marine Mammal Medicine*. Boca Raton: CRC Press, 2001, p.1116

DILBONE, R. P. Mycosis in a manatee. *J Am Vet Med Assoc*, v.147, p.1095-1097, 1965.

DOMINGO, M.; VISA, J.; PUMAROLA, M. Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*), *Vet. Pathol.*, v. 29, p.1–10, 1992.

DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; COSTELLO, E. K.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.107, n.26, p.11971-11975, 2010.

DUNN, J. L.; BUCK, J. D.; ROBECK, T. R. Bacterial diseases of cetaceans and pinnipeds. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. (Eds.). *Handbook of Marine Mammal Medicine*. Boca Raton: CRC Press, 2001, pp.309-336.

EIGELAND, K. A.; LANYON, J. M.; TROTT, D. J.; OUWERKERK, D.; BLANSHARD, W.; MILINOVICH, G. J. Bacterial Community Structure in the Hindgut of Wild and Captive Dugongs (*Dugong dugon*). *Aquatic Mammals*, v.38, p.402-411, 2012.

ELSNER, R. Cetacean physiology, Overview. In: PERRIN, W. F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, H. G. M. (Eds.). *Encyclopedia of marine mammals*. San Diego: Academic Press, 2002, p.225-229.

ESPERÓN, F.; GARCÍA-PÁRRAGA, D.; BELLIERE, E. N.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M. Molecular diagnosis of lobomycosis-like disease in a bottlenose dolphin in captivity. *Medical Mycology*, v.50, n.1, p.106-109, 2012.

FAIR, P. A.; SCHAEFER, A. M.; ROMANO, T. A.; BOSSART, G. D.; LAMB, S. V.; REIF, J. S. Stress response of wild bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) during capture–release health assessment studies. *General and comparative endocrinology*, v.206, p.203-212, 2014.

FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.50, n.3, p.1351-1371, 2000.

FORRESTER, D. J. *Parasites and diseases of wild mammals in Florida*. Gainesville: University Press of Florida, 1992, p. 459.

FERNANDÉZ, A.; EDWARDS, J. F.; RODRIGUEZ, F.; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; HERRÁEZ, P.; CASTRO, P.; JABER, J. R.; MARTIN, V.; ARBELO, M. Gas and fat embolic syndrome involving a mass stranding of beaked whales (Family Ziphiidae) exposed to sonar signals. *Vet Pathol*, v.42, p.446-457, 2005.

FRASCA, S.; DUNN, J. L.; COOKEV, J. C.; BUCK, J. D. Mycotic dermatitis in an Atlantic white-sided dolphin, a pygmy sperm whale, and two harbor seals. *J Am Vet Med Assoc*, v.208, p.727-729, 1996.

GALES, N.; WALLACE, G.; DICKSON, J. Pulmonary cryptococcosis in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Journal of wildlife diseases*, v.21, n.4, p.443-446, 1985.

GEISLER, J. H.; UHEN, M. D. Phylogenetic relationships of extinct cetartiodactyls: results of simultaneous analyses of molecular, morphological, and stratigraphic data. *Journal of Mammalian Evolution*, v. 12, n.1-2, p.145-160, 2005.

GERACI, J.; LOUNBURY, V. Health. In: PERRIN, W.F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, H.G.M. (Eds.). *Encyclopedia of marine mammals*. San Diego: Academic Press, 2002, p.562-570.

GERACI, J. R.; LOUNSBURY, V. J. *Marine Mammals Ashore : a field Guide for strandings*., Second Edition, Baltimore: National Aquarium in Baltimore, 2005, p.371.

GIRI, D. K.; SIMS, W. P.; SURA, R.; COOPER, J. J.; GAVRILOV, B. K.; MANSELL, J. Cerebral and Renal Phaeohyphomycosis in a Dog Infected With *Bipolaris* Species. *Veterinary Pathology*, v.48, n.3, p.754-757, 2010.

GRAVENA, W.; HRBEK, T.; DA SILVA, V.; ASTOLFI-FILHO, S. P. A. R. T. A. C. O.; FARIAS, I. P. Microsatellite loci for population and parentage analysis in the Amazon River dolphin (*Inia geoffrensis* de Blainville, 1817). *Molecular ecology resources*, v. 9, n.2, p.600-603, 2009.

GRAVENA, W.; DA SILVA, V.M.F.; HRBEK, T.; D'AFFONSECA, A.; ROSAS, F.; FARIAS, I. P. Novel papillomavirus identified from epithelial tissue of Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*). In: 15ª Reunión de Trabajo de Expertos en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, Puerto Madryn, 2012.

GROCH, K. R. Interação antropogênica e sanidade de baleias-jubarte (*Megaptera novaeangliae*) na costa brasileira. 2014. 128 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

GUNDE-CIMERMAN, N.; RAMOS, J.; PLEMENTAS, A. Halotolerant and halophilic fungi. *Mycol Res*, v.113, p.1231-1241, 2009

JACOBSEN, M. D.; BOUGNOUX, M. E.; D'ENFERT, C.; ODDS, F. C. Multilocus sequence typing of *Candida albicans* isolates from animals. *Research in microbiology*, v.159, n.6, p.436-440, 2008a.

JACOBSEN, M. D.; DUNCAN, A. D.; BAIN, J.; JOHNSON, E. M.; NAGLIK, J. R.; SHAW, D. J.; GOW, A. R.; ODDS, F. C. Mixed *Candida albicans* strain populations in colonized and infected mucosal tissues. *FEMS yeast research*, v.8, n.8, p.1334-1338, 2008b.

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

HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science* 336: 1268-1273, 2012.

HUGHES, S. N.; GREIG, D. J.; MILLER, W. A.; BYRNE, B. A.; GULLAND, F. M.; HARVEY, J. T. Dynamics of *Vibrio* with virulence genes detected in Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardii*) off California: implications for marine mammal health. *Microbial ecology*, v.65, n.4, p.982-994, 2013.

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

ICMBio. Plano de ação nacional para a conservação dos sirênios: peixe-boi-da- Amazônia: *Trichechus inunguis* e peixe-boi-marinho: *Trichechus manatus* In: DE ANDRADE, M. C. M.; LUNA, F. O.; REIS, M. .L. (Orgs). Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011a, p.80

ICMBio. Plano de ação nacional para a conservação dos mamíferos aquáticos – pequenos cetáceos In: ROCHA-CAMPOS, C. C.; CÂMARA, I. G.; PRETTO, D. J. (Orgs). Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011b, p.132.

ISIDORO-AYZA, M.; PÉREZ, L.; CABAÑES, F. J.; CASTELLÀ, G.; ANDRÉS, M.; VIDAL, E.; DOMINGO, M. Central Nervous System Mucormycosis Caused by *Cunninghamella Bertholletiae* in a Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of wildlife diseases*, v.50, n.3, p.634-638, 2014.

JEFFERSON, T. A., WEBBER, M. A., PITMAN, R. L. Marine mammals of the world: A comprehensive guide to their identification. San Diego: Academic Press, 2008, p.592.

JENSEN, E. D.; LIPSCOMB, T.; VAN BONN, B.; MILLER, G.; FRADKIN, J. M.; RIDGWAY, S. H. Disseminated histoplasmosis in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 29, p.456–460, 1998.

JOSEPH, B. E.; CORNELL, L. H.; SIMPSON, J. G.; MIGAKI, G.; GRINER, L. Pulmonary aspergillosis in three species of dolphin, *Zoo Biol.*, v. 5, p. 301–308, 1986.

KENNEDY-STOSKOPF, S. Viral diseases. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. (Eds). *Handbook of Marine Mammal Medicine*. Boca Raton: CRC Press, 2001, pp.285-309.

KIEBOOM, J.; DENNIS, J. J.; DE BONT, J. A.; ZYLSTRA, G. J. Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 1, p. 85-91, 1998.

KISZKA, J.; VAN BRESSEM, M. F.; PUSINERI, C. Lobomycosis-like disease and other skin conditions in Indo-Pacific bottlenose dolphins *Tursiops aduncus* from the Indian Ocean. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.84, n.2, p.151-157, 2009.

KNIGHTS, D.; COSTELLO, E. K.; KNIGHT, R. Supervised classification of human microbiota. *FEMS microbiology reviews*, v.35, n.2, p.343-359, 2011.

KRUSE, H.; SORUM, H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, p.4015–4021, 1994.

LIMA, N.; ROGERS, T.; ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; BROWN, M. V. Temporal stability and species specificity in bacteria associated with the bottlenose dolphins respiratory system. *Environmental microbiology reports*, v.4, n.1, p.89-96, 2012.

MARQUEZ, M.; RODENAS, S.; MOLIN, J.; RABANAL, R. M.; FONDEVILA, D.; AÑOR, S.; PUMAROLA, M. Protothecal pyogranulomatous meningoencephalitis in a dog without evidence of disseminated infection. *Veterinary Record*, v. 171, n.4, p.100-100, 2012.

MARSH, H.; O'SHEA, T.; REYNOLDS, J. E. *Ecology and Conservation of the Sirenia: Dugongs and Manatees*. 1st edition, Cambridge: Cambridge University Press, 2011, p. 536.

MARTINS, H. M.; DIAS, M. I.; MARTINS, M. L.; BERNARDO, F. Leveduroses oportunistas do tracto respiratório de delfinídeos em cativeiro. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.97, p.189-192, 2002.

MC GINNIS, M. R.; RINALDI, M. G.; WINN, R. E. Emerging agents of phaeohyphomycosis: pathogenic species of *Bipolaris* and *Exserohilum*. *J. Clin. Microbiol* , v.24, n.2, p.250-259, 1986

MCMANUS, B. A.; COLEMAN, D. C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infection, Genetics and Evolution*, v.21, p.166-178, 2014.

MERSON, S. D.; OUWERKERK, D.; GULINO, L. M.; KLIEVE, A.; BONDE, R. K.; BURGESS, E. A.; LANYON, J. M. Variation in the hindgut microbial communities of the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris* over winter in Crystal River, Florida. *FEMS Microbiol Ecol*, v.87, p.601-615, 2013.

MIGAKI, G.; JONES, S. R. Mycotic diseases in marine mammals. In: HOWARD, E. B. (Ed.) *Pathobiology of Marine Mammal Diseases*. Volume II, Boca Raton: CRC Press, 1983, p. 1–12.

MIGAKI, G. 21 Selected dermatoses of marine mammals. *Clinics in dermatology*, v.5, n.3, p.155-164, 1987.

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

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

MORRIS, P. J.; JOHNSON, W. R.; PISANI, J.; BOSSART, G. D.; ADAMS, J.; REIF, J. S.; FAIR, P. A. Isolation of culturable microorganisms from free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the southeastern United States. *Veterinary microbiology*, v.148, n.2, p.440-447, 2011.

MOUTON, M.; REEB, D.; BOTHA, A.; BEST, P. Yeast infection in a beached southern right whale (*Eubalena australis*) neonate. *Journal of Wildlife Diseases*, v.45, n.3, p.692-699, 2009.

MOUTON, M.; PRZYBYLOWICZ, W.; MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J.; POSTMA, F.; THORNTON, M.; ARCHER, E.; BOTHA, A. Linking the occurrence of cutaneous opportunistic fungal invaders with elemental concentrations in false killer whale (*Pseudorca crassidens*) skin. *Environmental microbiology reports*, 2015.

MÜLLER, F. M. C.; STAUDIGEL, A.; SALVENMOSER, S.; TREDUP, A.; MILTENBERGER, R.; HERRMANN, J. V. Cross-resistance to medical and agricultural azole drugs in yeasts from the oropharynx of human immunodeficiency virus patients and from environmental Bavarian vine grapes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v.51, n.8, p.3014-3016, 2007

NAPLES, L. M.; POLL, C. P.; BERZINS, I. K. Successful treatment of a severe case of fusariomycosis in a beluga whale (*Delphinapterus leucas leucas*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.43, n.3, p.596-602, 2012.

NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, v. 31, n.7, p.1399-1412, 2012.

NELSON, T. M.; APPRILL, A.; MANN, J.; ROGERS, T. L.; BROWN, M. V. The marine mammal microbiome: current knowledge and future directions. *Microbiology Australia*, v. 36, n.1, p.8-13, 2015.

NIELSEN, K. A.; OWEN, H. C.; MILLS, P. C.; FLINT, M.; GIBSON, J. S. Bacteria isolated from dugongs (*Dugong dugon*) sub-mitted for postmortem examination in Queensland, Australia, 2000–2011. *J Zoo Wildlife Med*, v.44, p.35-41, 2013.

NYMO, I. H.; TRYLAND, M.; GODFROID, J. A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*). *Veterinary research*, v.42, n.1, p.1-14, 2011.

NORMAN, S. A.; RAVERTY, S.; ZABEK, E.; ETHERIDGE, S.; FORD, J. K.; HOANG, L. M.; MORSHED, M. Maternal–fetal transmission of *Cryptococcus gattii* in harbor porpoise. *Emerging infectious diseases*, v.17, n.2, p.304-305, 2011.

ODDS, F. C.; DAVIDSON, A. D.; JACOBSEN, M. D.; TAVANTI, A.; WHYTE, J. A.; KIBBLER, C. C.; ELLIS, D. H.; MAIDEN, M. C. J.; SHAW, D. J.; GOW, N. A. R. *Candida*

albicans strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.10, 3647-3658, 2006.

ODDS, F. C.; BOUGNOUX, M. E.; SHAW, D. J.; BAIN, J. M.; DAVIDSON, A. D.; DIOGO, D.; JACOBSEN, M. D.; LECOMTE, M.; , LI, S. Y.; TAVANTI, A.; MAIDEN, M. C.; GOW, N. A.; D'ENFERT, C. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, v.6, n.6, p.1041-1052, 2007.

ODDS, F. C. In *Candida albicans*, resistance to flucytosine and terbinafine is linked to MAT locus homozygosity and multilocus sequence typing clade 1. *FEMS yeast research*, v.9, n.7, p.1091-1101, 2009.

ODDS, F. C. Molecular phylogenetics and epidemiology of *Candida albicans*. *Future Microbiology*, v. 5, n.1, p.67-79, 2010.

OGAWA, G.; ISHIDA, M.; KATO, H.; FUJISE, Y.; URANO, N. Identification of facultative anaerobic bacteria isolated from the intestine of the minke whale *Balaenoptera acutorostrata* by 16S rRNA sequencing analysis. *Fisheries Science*, v.76,n.2, p.177-181, 2010.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, v.72, p.157–165, 2008.

PELTIER, H.; DABIN, W.; DANIEL, P.; VAN CANNEYT, O.; DORÉMUS, G.; HUON, M.; RIDOUX, V. The significance of stranding data as indicators of cetacean populations at sea: Modelling the drift of cetacean carcasses. *Ecological Indicators*, v.18, p.278-290, 2012.

PERFECT, J. R.; ALEXANDER, B. D.; SCHELL, W. A. Phaeohyphomycoses (Brown-Black Moulds). In: KAUFFMAN, C. A.; PAPPAS, P. G.; SOBEL, J. D.; DISMUKES, W. E. (eds.) *Essentials of Clinical Mycology*. Springer Science + Business Media, New York, NY, pp. 305-317, 2001

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Unusual fungal and pseudofungal infections of humans. *Journal of clinical microbiology*, v.43, n.4, p.1495-1504, 2005.

PRAHL, S.; JEPSON, P. D.; SANCHEZ-HANKE, M.; DEAVILLE, R.; SIEBERT, U. Aspergillosis in the middle ear of a harbour porpoise (*Phocoena phocoena*): a case report. *Mycoses*, v.54, n.4, e260-e264, 2011.

PUJOL, I.; GUARRO, J.; GENE, J.; SALA, J. In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 39, p.163–167, 1997.

RADHOUANI, H.; SILVA, N.; POETA, P.; TORRES, C.; CORREIA, S.; IGREJAS, G. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. *Frontiers in microbiology*, v.5, 2014.

RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; HEILIG, H. G.; TIMS, S.; ZOETENDAL, E. G.; VOS, W. M. Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environmental microbiology*, v.15, n.4, p.1146-1159, 2013.

RAVI, S.; PIERCE, C.; WITT, C.; WORMLEY JR., F.L. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans* Under Distinct Environmental Conditions. *Mycopathologia*. v.167, p.307–314, 2009.

REDDY, M. L.; DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. Marine Mammals as Sentinels of Ocean Health. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. (Eds). *Handbook of Marine Mammal Medicine*. Boca Raton: CRC Press, 2001, pp.3-13.

REEVES, R. R. Conservation efforts. In: PERRIN, W. F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, H. G. M. (Eds.). *Encyclopedia of marine mammals*. San Diego: Academic Press, 2002, p.276-297.

REIDARSON, T. H.; GRINER, L. A.; PAPPAGIANIS, D.; MCBAIN, J. Coccidioidomycosis in a bottlenose dolphin. *J Wildl Dis*, v.34, p.629-631, 1998.

REIDARSON, T.H.; MCBAIN, J.F.; DALTON, L.M.; RINALDI, M.G. Mycotic diseases. In: In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. (Eds). *Handbook of Marine Mammal Medicine*. Boca Raton: CRC Press, 2001, pp.337-355.

REVANKAR, S. J.; PATTERSON, J. E.; SUTTON, D. A.; PULLEN, R.; RINALDI, M. G. Disseminated Phaeohyphomycosis: Review of an Emerging Mycosis. *Clinical Infectious Diseases*, v.34, p.467–476, 2002.

ROBECK, T. R.; DALTON, L. M. *Saksenaea vasiformis* and *Apophysomyces elegans* zygomycotic infections in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), a killer whale (*Orcinus orca*), and Pacific white-sided dolphins (*Lagenorhynchus obliquidens*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.33, n.4, p.356-366, 2002.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; DIAZ-GUERRA, T. M.; MELLADO, E.; CANO, V.; TAPIA, C.; PERKINS, A.; GOMEZ-LOPEZ, A.; RODERO, L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v.49, n.10, p.4026-4034, 2005.

ROSE, J. M.; GAST, R. J.; BOGOMOLNI, A.; ELLIS, J. C.; LENTELL, B. J.; TOUHEY, K.; MOORE, M. Occurrence and patterns of antibiotic resistance in vertebrates off the Northeastern United States coast. *FEMS microbiology ecology*, v.67, n.3, p.421-431, 2009.

ROSENTHAL, M.; GOLDBERG, D.; AIELLO, A.; LARSON, E.; FOXMAN, B. Skin microbiota: microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infection, Genetics and Evolution*, v.11, n.5, p.839-848, 2011.

ROTSTEIN, D. S.; BURDETT, L. G.; MCLELLAN, W.; SCHWACKE, L.; ROWLES, T.; TERIO, K. A.; SCHULTZ, S.; PABST, A. Lobomycosis in offshore bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), North Carolina. *Emerging infectious diseases*, v.15, n.4, p.588-590, 2009.

ROTSTEIN, D. S.; WEST, K.; LEVINE, G.; LOCKHART, S. R.; RAVERTY, S.; MORSHED, M. G.; ROWLES, T. *Cryptococcus gattii* in a spinner dolphin (*Stenella longirostris*) from Hawaii. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.41, n.1, p.181-183, 2010.

SANFORD, J. A.; GALLO, R. L. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Semin Immunol*, v.25, p.370– 377, 2013.

SATO, T.; SHIBUYA, H.; OHBA, S.; NOJIRI, T.; SHIRAI, W. Mycobacteriosis in two captive Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). *J Zoo Wildlife Med*, v.34, p.184-188, 2003.

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

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.396.

SIDRIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; BRILHANTE, R. S. N.; SOARES, G. D. P.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. *Candida* species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): *In vitro* antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. *Veterinary Microbiology*, v.145, p.324-328, 2010.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, v.36, n.2, p.288-305, 2012.

SKURNIK, D.; BONNET, D.; BERNEDE-BAUDUIN, C.; MICHEL, R.; GUETTE, C.; BECKER, J. M.; BALAIRE, C.; CHAU, F.; MOHLER, J.; JARLIER, V.; BOUTIN, J. P.; MOREAU, B.; GUILLEMOT, D.; DENAMUR, E.; ANDREMONT, A.; RUIMY, R.

Characteristics of human intestinal *Escherichia coli* with changing environments. *Environ.Microbiol*, v.10, p.2132–2137, 2008

STAGGS, L.; ST. LEGER, J.; BOSSART, G.; TOWNSEND JR, F. I.; HICKS, C.; RINALDI, M. A novel case of *Fusarium oxysporum* infection in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.41, n.2, p.287-290, 2010.

STEWART, J. R.; GAST, R. J.; FUJIOKA, R. S.; SOLO-GABRIELE, H. M.; MESCHKE, J. S.; AMARAL-ZETTLER, L. A.; HOLLAND, A. F. The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. *Environ Health*, v.7, S3, 2008..

SYMMERS, W. S. Possible case of Lobo's disease acquired in Europe from a bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*). *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, v.76, p.777–784, 1983.

TABUCHI, K.; MUKU, T.; SATOMICHI, T.; HARA, M.; IMAI, N.; IWAMOTO, Y. A dermatosis in manatee (*Trichechus manatus*): mycological report of a case. *Bulletin Azabu Veterinary College*, v.28, p.127-134, 1974

TAJIMA, Y.; SASAKI, K.; KASHIWAGI, N.; YAMADA, T. K. A case of stranded Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*) with lobomycosis-like skin lesions in Kinkowan, Kagoshima, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.0, 2015.

TAKAHASHI, H.; UEDA, K.; ITANO, E. N.; YANAGISAWA, M.; MURATA, Y.; MURATA, M.; YAGUCHI, T.; MURAKAMI, M.; KAMEI, K.; INOMATA, T.; MIYAHARA, H.; SANO, A.; UCHIDA, S. *Candida albicans* and *C. tropicalis* isolates from the expired breathes of captive dolphins and their environments in an aquarium. *Veterinary Medicine International*, v.2010, p.1-12, 2010.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A.; MAIDEN, M. C.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.1, p.284-292, 2005.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat.Rev.Microbiol*, v.8, p.207–217, 2010

TORNO, C. S.; BUCCAT, M. C.; MASANGKAY, J. S. Aspergillosis in a melon-headed whale (*Peponocephala electra*). *Philippine Journal of Veterinary Medicine*, v.45, n.1, p. 49-57, 2009.

TOWNSEND, F. I. Medical management of stranded small cetaceans. In: Fowler, M.E. (Ed.). *Zoo & Wild Animal Medicine: Current Therapy 4*, Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999, p.485-493.

TSUKINOWA, E.; KARITA, S.; ASANO, S.; WAKAI, Y.; OKA, Y.; FURUTA, M.; GOTO, M. Fecal microbiota of a dugong (*Dugong dugong*) in captivity at Toba Aquarium. *The Journal of general and applied microbiology*, v.54, n.1, 25-38, 2008.

UEDA, K.; SANO, A.; YAMATE, J.; ITANO NAKAGAWA, E.; KUWAMURA, M.; IZAWA, T.; TANAKA, M.; HASEGAWA, Y.; CHIBANA, H.; IZUMISAWA, Y.; MIYAHARA, H.; UCHIDA, S. Two Cases of Lacaziosis in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) in Japan. *Case Reports in Veterinary Medicine*, p. 1-9, 2013.

URUBSCHUROV, V.; JANCZYK, P. Biodiversity of Yeasts in the Gastrointestinal Ecosystem with Emphasis on Its Importance for the Host. In: GRILLO, O.; VENORA, G. (Orgs.). *The Dynamical Processes of Biodiversity-Case Studies of Evolution and Spatial Distribution*, Rijeka: INTECH, 2011, p.277-302.

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

VEDROS, N. A.; QUINLIVAN, J.; CRANFORD, R. Bacterial and fungal flora of wild northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). *J Wildl Dis*, v.18, p.447-456, 1982.

VENN-WATSON, S.; COLEGROVE, K. M.; LITZ, J.; KINSEL, M.; TERIO, K.; SALIKI, J.; FIRE, S.; CARMICHEL, S.; CHEVIS, C.; HATCHETT, W.; PITCHFORD, J.; TUMLIN, M.; FIELD, C.; SMITH, S.; EWING, R.; FAUQUIER, D.; LOVEWELL, G.; WHITEHEAD, H.; ROTSTEIN, D.; MCFEE, W.; FOUGERES, E.; ROWLES, T. Adrenal Gland and Lung Lesions in Gulf of Mexico Common Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) Found Dead following the Deepwater Horizon Oil Spill. *Plos One*, v.10, n.5, e0126538 , 2015.

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

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

VIDOTTO, V.; PONTÓN, J.; AOKI, S.; QUINDÓS, G.; MANTOAN, B.; PUGLIESE, A.; ITO KUWA, S.; NAKAMURA, K.. Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. *Revista Iberoamericana de Micología*. v.21, p.70-74, 2004.

WALLACE, C. C.; YUND, P. O.; FORD, T. E.; MATASSA, K. A.; BASS, A. L. Increase in antimicrobial resistance in bacteria isolated from stranded marine mammals of the Northwest Atlantic. *EcoHealth*, v.10, n.2, p.201-210, 2013.

WALTZEK, T. B.; CORTE-HINOJOSA, G., WELLEHAN JR, J. F. X.; GRAY, G. C. Marine mammal zoonoses: a review of disease manifestations. *Zoonoses and Public Health*, v. 59, p.521-535, 2012.

WOODRUFF, R. A.; BONDE, R. K.; BONILLA, J. A.; ROMERO, C. H. Molecular identification of a Papilloma virus from *Cutaneous lesions* of captive and free-ranging Florida Manatees. *J Wildlife Dis* 41: 437–441, 2005.

WROBEL, L.; WHITTINGTON, J. K.; PUJOL, C.; OH, S. H.; RUIZ, M. O.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; SOLL, D.R.; HOYER, L. L. Molecular phylogenetic analysis of a geographically and temporally matched set of *Candida albicans* isolates from humans and nonmigratory wildlife in central Illinois. *Eukaryotic cell*, v.7, n.9, p.1475-1486, 2008.

WÜNSCHMANN, A.; SIEBERT, U.; WEISS, R. Rhizopusmycosis in a harbor porpoise from the Baltic Sea. *Journal of wildlife diseases*, v.35, n.3, p.569-573, 1999.

ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; GONÇALVES, F. F.; KURZ, M. H. S.; MISTURA, C. M. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicides in surface and agricultural waters. *Journal of Separation Science*, v.26, n. 9-10, p. 935-938, 2003.

ANEXO A – ARTIGOS PUBLICADO

NCBI Resources ▾ How To ▾

PubMed.gov
US National Library of Medicine
National Institutes of Health

PubMed ▾

Advanced

Abstract ▾

Send to: ▾

[Dis Aquat Organ](#), 2015 Feb 10;113(1):69-73. doi: 10.3354/dao02827.

Bipolaris hawaiiensis as an emerging cause of cutaneous phaeoophomycosis in an Antillean manatee *Trichechus manatus manatus*.

[Sidrim JJ¹](#), [Carvalho VL](#), [Maia D](#), [Brilhante RS](#), [Meirelles AC](#), [Silva CP](#), [Cordeiro Rd](#), [Moreira JL](#), [Bandeira T](#), [Rocha MF](#).

⊕ Author information

Abstract

Phaeoophomycoses are emerging and opportunistic diseases caused by dematiaceous fungi that infect many animal species. This paper describes a case of cutaneous phaeoophomycosis in an Antillean manatee *Trichechus manatus manatus* caused by *Bipolaris hawaiiensis*. Blackish skin lesions were observed in an Antillean manatee calf held captive in Brazil. Direct examination of skin scraping from the affected areas revealed the presence of dematiaceous hyphae. Culture of skin fragments led to the isolation and subsequent identification of *B. hawaiiensis* as the etiologic agent. Treatment with itraconazole for 14 d was effective. Infections by *Bipolaris* spp. are rare in animals, and this is the first report of *B. hawaiiensis* in veterinary medicine.

Format: Abstract ▾

Send to ▾

Can J Microbiol. 2015 Oct;61(10):763-9. doi: 10.1139/cjm-2015-0341. Epub 2015 Jul 23.

Yeast microbiota of natural cavities of manatees (*Trichechus inunguis* and *Trichechus manatus*) in Brazil and its relevance for animal health and management in captivity.

Sidrim JJ¹, Carvalho VL^{1,2}, Castelo-Branco Dde S¹, Brilhante RS¹, Bandeira Tde J¹, Cordeiro Rde A¹, Guedes GM¹, Barbosa GR¹, Lazzarini SM³, Oliveira DC³, de Meirelles AC², Attademo FL⁴, Freire AC⁴, Moreira JL¹, Monteiro AJ⁵, Rocha MF^{1,6}.

⊕ Author information

Abstract

The aim of this study was to characterize the yeast microbiota of natural cavities of manatees kept in captivity in Brazil. Sterile swabs from the oral cavity, nostrils, genital opening, and rectum of 50 *Trichechus inunguis* and 26 *Trichechus manatus* were collected. The samples were plated on Sabouraud agar with chloramphenicol and incubated at 25 °C for 5 days. The yeasts isolated were phenotypically identified by biochemical and micromorphological tests. Overall, 141 strains were isolated, of which 112 were from *T. inunguis* (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida pelliculosa*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida famata*, *Candida krusei*, *Candida norvegensis*, *Candida ciferri*, *Trichosporon* sp., *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus laurentii*) and 29 were from *T. manatus* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *Rhodotorula* sp., *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula minuta*, *Trichosporon* sp.). This was the first systematic study to investigate the importance of yeasts as components of the microbiota of sirenians, demonstrating the presence of potentially pathogenic species, which highlights the importance of maintaining adequate artificial conditions for the health of captive manatees.

KEYWORDS: *Candida* spp.; *Rhodotorula* sp.; *Trichosporon* sp.; colonisation; colonization; sirenians; siréniens

Format: Abstract ▾

Send to ▾

[Ecohealth](#). 2016 Jun;13(2):328-38. doi: 10.1007/s10393-015-1090-8. Epub 2016 Jan 26.

Antifungal Resistance and Virulence Among *Candida* spp. from Captive Amazonian manatees and West Indian Manatees: Potential Impacts on Animal and Environmental Health.

Sidrim JJ¹, Carvalho VL^{1,2}, de Souza Collares Maia Castelo-Branco D¹, Brilhante RS³, de Melo Guedes GM¹, Barbosa GR¹, Lazzarini SM⁴, Oliveira DC⁴, de Meirelles AC², Attademo FL⁵, da Bôaviagem Freire AC⁵, de Aquino Pereira-Neto W⁶, de Aquiar Cordeiro R¹, Moreira JL¹, Rocha ME^{1,7}.

⊕ Author information

Abstract

This work aimed at evaluating the antifungal susceptibility and production of virulence factors by *Candida* spp. isolated from sirenians in Brazil. The isolates (n = 105) were recovered from the natural cavities of Amazonian and West Indian manatees and were tested for the susceptibility to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole and for the production of phospholipases, proteases, and biofilm. The minimum inhibitory concentrations (MICs) for amphotericin B ranged from 0.03 to 1 µg/mL, and no resistant isolates were detected. Itraconazole and fluconazole MICs ranged from 0.03 to 16 µg/mL and from 0.125 to 64 µg/mL, respectively, and 35.2% (37/105) of the isolates were resistant to at least one of these azole drugs. Concerning the production of virulence factors, phospholipase activity was observed in 67.6% (71/105) of the isolates, while protease activity and biofilm production were detected in 50.5% (53/105) and 32.4% (34/105) of the isolates, respectively. Since the natural cavities of manatees are colonized by resistant and virulent strains of *Candida* spp., these animals can act as sources of resistance and virulence genes for the environment, conspecifics and other animal species, demonstrating the potential environmental impacts associated with their release back into their natural habitat.

KEYWORDS: azole resistance; sirenians; virulence factors; yeasts

ANEXO C - BANCO DE DADOS

Registro/ nome	Espécie	Local	Data da coleta	Isolamento primário	Cepa	Sítio anatômico	Fungo (s) isolado (s)	Sensibilidade			Virulência		
								AMB	ITC	FLC	Fosfolipase	Protease	Biofilme
Morena	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	1O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	FP	P	PFO
Preta Anastácia	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Iara	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aira	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laia Mowatcha	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	5°	Oral	<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	-	-	-	-
Taís	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Juçara	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	7O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	S	P	P	NP
Miri	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taba	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	9O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	P	NP
Ciça	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	10O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	P	NP
Tucumanduba	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	11O	Oral	<i>Candida orthopsilosis</i>	S	S	S	NP	P	NP
Amã	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	12G	Genital	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	-	-	-	-	-
Castanho	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	13O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	S	P	P	PF
					13O2	Oral	<i>Trichosporon sp.</i>	-	-	-	-	-	-
Audaz	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	14O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	P	NP
					14G1	Genital	<i>Candida tropicalis</i>	S	R	R	NP	P	PFO
					14G2	Genital	<i>Trichosporon sp.</i>	-	-	-	-	-	-
					14R1	Retal	<i>Candida tropicalis</i>	S	R	R	P	NP	PF
					14R2	Retal	<i>Candida guilliermondii</i>	S	S	S	P	NP	NP
14R3	Retal	<i>Trichosporon sp.</i>	-	-	-	-	-	-					
Muracajaí	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	15O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	S	P	P	NP
Bumbá	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	16O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	P	NP
					16G	Genital	<i>Trichosporon sp.</i>	-	-	-	-	-	-
					16R	Retal	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	S	S	S	P	NP	PF

Bacaba	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	17O1	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	S	PF	NP	NP
					17O2	Oral	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
					17N	Nasal	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	S	S	S	NP	NP	PM
					17G	Genital	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
					17R1	Retal	<i>Candida guilliermondii</i>	S	S	S	PF	NP	PM
					17R2	Retal	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
Aricoroa	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	18O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	S	P	P	NP
					18G	Genital	<i>Candida guilliermondii</i>	S	S	S	NP	NP	NP
Buri	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	19R1	Retal	<i>Candida guilliermondii</i>	S	S	S	NP	NP	NP
					19R2	Retal	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
Flor	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macurucanã	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	21N	Nasal	<i>Candida cifferi</i>	S	S	S	NP	NP	NP
					21G	Genital	<i>Candida albicans</i>	S	R	S	P	P	NP
					21R1	Retal	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
					21R2	Retal	<i>Rhodotorula</i> sp.	-	-	-	-	-	-
					21R3	Retal	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	S	S	S	NP	NP	NP
Ita	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	
Piorini	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	23O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	S	PF	P	NP
					23G	Genital	<i>Candida albicans</i>	S	R	S	P	P	NP
					23R	Retal	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	S	S	S	NP	NP	PM
Ipiranga	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	24G	Genital	<i>Candida albicans</i>	S	R	S	P	P	NP
					24R1	Retal	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	P	NP
					24R2	Retal	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
					24R3	Retal	<i>Rhodotorula</i> sp.	-	-	-	-	-	-
Ciranda	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	25O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	S	P	P	NP
					25G	Genital	<i>Candida norvegensis</i>	S	S	S	NP	NP	NP
					25R1	Retal	<i>Candida famata</i>	S	S	S	NP	NP	NP
					25R2	Retal	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
Maraã	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	26O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	S	PF	P	NP

Olívia	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bela	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Soriana	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	29O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	P	PF
Çari	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	30O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	PF	P	PF
					30R	Retal	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	P	PF
Arapapá	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	31O	Oral	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
					31G	Genital	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
					31P1	Pele	<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	-	-	-
					31P2	Pele	<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	-	-	-	-
Piraí	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	32O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	P	NP
					32G	Genital	<i>Candida guilliermondii</i>	S	S	S	NP	NP	NP
Caramurí Cult	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	33O1	Oral	<i>Candida guilliermondii</i>	S	S	S	P	NP	PFO
					33O2	Oral	<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	-	-	-	-
					33G	Genital	<i>Candida guilliermondii</i>	S	S	S	P	NP	PM
					33R1	Retal	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
					33R2	Retal	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	S	S	S	NP	P	NP
Itara	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	34O1	Oral	<i>Candida guilliermondii</i>	S	S	S	P	NP	NP
					34O2	Oral	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
					34G	Genital	<i>Candida krusei</i>	S	S	S	P	NP	NP
Xuracá	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	35O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	S	P	P	NP
					35G	Genital	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	P	NP
Capitari	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	36O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	PF	P	NP
					36R	Retal	<i>Candida pelliculosa</i>	S	S	S	PF	NP	NP
Catano	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	37N	Nasal	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	S	S	S	NP	NP	NP
					37G	Genital	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	P	NP
					37R	Retal	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
Moju	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	38O1	Oral	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	S	S	S	NP	NP	NP
					38O2	Oral	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
					38G	Genital	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	P	NP

					38R	Retal	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
Paris	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	39O	Oral	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	S	S	S	NP	NP	PF
					39G	Genital	<i>Candida albicans</i>	S	S	R	P	NP	NP
					39R1	Retal	<i>Candida pelliculosa</i>	S	S	S	PF	NP	NP
					39R2	Retal	<i>Candida albicans</i>	S	R	S	P	NP	NP
					39R3	Retal	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
Manaiá	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	40G	Genital	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	NP	NP
					40R	Retal	<i>Candida orthopsilosis</i>	S	S	S	NP	NP	PF
Caapiranga	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	41O1	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	P	NP
					41O2	Oral	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
					41G1	Genital	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	S	S	S	NP	P	PF
					41R	Retal	<i>Candida metapsilosis</i>	S	S	S	NP	NP	NP
Preto	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	42O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	R	NP	NP	NP
					42G	Genital	<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	-	-	-	-
					42R	Retal	<i>Candida metapsilosis</i>	S	S	S	NP	NP	NP
Marcelo	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	43O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	P	NP
					43N	Nasal	<i>Candida glabrata</i>	S	S	S	PF	NP	NP
					43G1	Genital	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	S	S	S	NP	P	PM
					43G2	Genital	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
Itati	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	44O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	P	NP
					44G1	Genital	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	P	NP
					44G2	Genital	<i>Candida pelliculosa</i>	S	S	S	PF	NP	NP
					44R	Retal	<i>Candida glabrata</i>	S	S	S	P	NP	NP
Uacu Ticuna	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	45O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	R	P	P	PF
					45N1	Nasal	<i>Candida metapsilosis</i>	S	S	S	PF	NP	NP
					45N2	Nasal	<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	-	-	-	-
					45G	Genital	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	S	S	S	NP	P	NP
					45R	Retal	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	S	S	S	NP	NP	NP
Tintin	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	46O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	P	NP

					46G	Genital	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	P	NP
Uatumã	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	47O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	P	NP
					47G	Genital	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	S	S	S	NP	NP	NP
Broocke	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	48O	Oral	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	S	S	S	NP	NP	PF
Manicoré	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Positivo	49O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	P	PF
					49G1	Genital	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	P	PF
					49G2	Genital	<i>Candida orthopsilosis</i>	S	S	S	NP	NP	PM
Sol	<i>Trichechus inunguis</i>	CPPMA	18/02/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canoa	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	51O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	P	NP
					51N	Nasal	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	P	PF
					51G	Genital	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	-
Parajuru	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	52G	Genital	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	-
					52R	Retal	<i>Rhodotorula sp.</i>	-	-	-	-	-	-
Ivi	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	53G	Genital	<i>Rhodotorula minuta</i>	-	-	-	-	-	-
					53R	Retal	<i>Candida famata</i>	S	S	S	NP	NP	NP
Clara	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	54O	Oral	<i>Candida tropicalis</i>	S	S	R	P	P	NP
Netuno	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	55O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	P	PF
Xuxa	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carla	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	57O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	NP	PF
Sereia	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	58O1	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	PF	P	NP
					58O2	Oral	<i>Candida famata</i>	S	S	S	NP	NP	NP
					58O3	Oral	<i>Candida guilliermondii</i>	S	S	S	NP	NP	NP
Diogo	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	59G	Genital	<i>Candida guilliermondii</i>	S	S	S	NP	NP	NP
Raimundo	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	60O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	P	P	PF
Poque	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	61O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	R	R	PF	P	PFO
					61R	Retal	<i>Candida famata</i>	S	S	S	NP	NP	NP
Arati	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	62O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	P	NP
Sheila	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	63O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	P	PF
Marbela	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	64G	Genital	<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	P	NP	PF

Quitéria	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	65N	Nasal	<i>Trichosporon</i> sp.	-	-	-	-	-	-
Joana	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	66N	Nasal	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	P	PF
Daniel	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	67O	Oral	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	PF	P	PF
					67R	Retal	<i>Candida krusei</i>	S	S	S	P	NP	PM
Branca	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zoé	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Positivo	69N	Nasal	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	P	P	PF
Natália	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Folião	<i>Trichechus manatus</i>	CMA	05/11/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02S0112/57	<i>Trichechus manatus</i>	Aquasis	19/10/12	Positivo	AQ57N	Nasal	<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	PF	NP	NP
02S0111/58	<i>Trichechus manatus</i>	Aquasis	17/01/13	Positivo	AQ58O	Oral	<i>Candida famata</i>	S	S	S	P	NP	NP
					AQ58R	Retal	<i>Candida guilliermondii</i>	S	S	S	P	NP	NP
02S0111/59	<i>Trichechus manatus</i>	Aquasis	23/03/13	Positivo	AQ59G	Genital	<i>Candida tropicalis</i>	S	R	S	NP	NP	PF
08S0112/17	<i>Trichechus manatus</i>	Aquasis	29/07/14	Positivo	AQ17P1	Pele	<i>Bipolaris hawaiiensis</i>	-	-	-	-	-	-
					AQ17P2	Pele	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-	-
02S0111/63	<i>Trichechus manatus</i>	Aquasis	02/04/14	Positivo	AQ63P	Pele	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-	-
02S0111/65	<i>Trichechus manatus</i>	Aquasis	10/02/15	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02S0111/66	<i>Trichechus manatus</i>	Aquasis	10/02/15	Positivo	AQ66P	Pele	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-	-
02S0111/68	<i>Trichechus manatus</i>	Aquasis	03/03/15	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
08S0112/19	<i>Trichechus manatus</i>	Aquasis	10/02/15	Positivo	AQ19P	Pele	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-	-
02S0112/70	<i>Trichechus manatus</i>	Aquasis	24/03/15	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02S0111/71	<i>Trichechus manatus</i>	Aquasis	24/03/15	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02C0521/544	<i>Kogia breviceps</i>	Itapipoca, Ceará	29/05/12	Positivo	544E	Espiráculo	<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	P	NP	NP
02C0511/556	<i>Kogia sima</i>	Amontada, Ceará	02/08/12	Positivo	556E	Espiráculo	<i>Candida tropicalis</i>	S	R	R	NP	NP	PFO
					556G	Genital	<i>Candida tropicalis</i>	S	R	R	P	NP	NP
					556R	Retal	<i>Candida famata</i>	S	S	S	PF	NP	NP
02C1511/562	<i>Peponocephala electra</i>	Aracati, Ceará	05/09/12	Positivo	562O	Oral	<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	NP	NP	PF

02C0411/564	<i>Physeter macrocephalus</i>	Fortaleza, Ceará	11/09/12	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02C0512/585	<i>Kogia sima</i>	Fortaleza, Ceará	04/06/13	Positivo	585R	Retal	<i>Prototheca</i> sp.	-	-	-	-	-	-
02C0511/586	<i>Kogia sima</i>	Fortaleza, Ceará	04/06/13	Positivo	586O	Oral	<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	P	P	PFO
					586E	Espiráculo	<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	P	P	PM
					586G	Genital	<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	P	P	PFO
					586R	Retal	<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	P	P	PM
02C0211/594	<i>Megaptera novaeangliae</i>	Trairi, Ceará	30/08/13	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	
1 (K)	<i>Inia geoffrensis</i>	Rio Negro, Amazonas	02/02/15	Positivo	B1G	Genital	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-
2 (M)	<i>Inia geoffrensis</i>	Rio Negro, Amazonas	02/02/15	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 (R)	<i>Inia geoffrensis</i>	Rio Negro, Amazonas	02/02/15	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 (A)	<i>Inia geoffrensis</i>	Rio Negro, Amazonas	03/02/15	Positivo	B4G	Genital	<i>Candida</i> sp.	-	-	-	-	-	-
5 (Z)	<i>Inia geoffrensis</i>	Rio Negro, Amazonas	03/02/15	Positivo	B5G	Genital	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-
					B5R	Retal	<i>Cryptococcus</i> sp.						
6 (Y)	<i>Inia geoffrensis</i>	Rio Negro, Amazonas	03/02/15	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7 (J)	<i>Inia geoffrensis</i>	Rio Negro, Amazonas	04/02/15	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 (W)	<i>Inia geoffrensis</i>	Rio Negro, Amazonas	05/02/15	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 (C)	<i>Inia geoffrensis</i>	Rio Negro, Amazonas	05/02/15	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 (P)	<i>Inia geoffrensis</i>	Rio Negro,	05/02/15	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		Amazonas											
11 (N)	<i>Inia geoffrensis</i>	Rio Negro, Amazonas	05/02/15	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12 (d)	<i>Inia geoffrensis</i>	Rio Negro, Amazonas	05/02/15	Positivo	B12R	Retal	<i>Candida famata</i>	-	-	-	-	-	-
14 (II)	<i>Inia geoffrensis</i>	Rio Negro, Amazonas	06/02/15	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S= sensível; R = resistente; NP = não produtora; P = produtora; FP = fortemente produtora; PF = produtora fraca; PM = produtora moderada; PFO = produtora forte