

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

BEATRIZ REGINA RODRIGUES CARVALHO

**OCORRÊNCIA DE *Encephalitozoon intestinalis* EM
TAMANDUÁ BANDEIRA (*Myrmecophaga tridactyla*) E TATUS
(*Priodontes maximus*, *Euphractus sexcinctus*, *Cabassous u.
squamicaudis*) DO MATO GROSSO DO SUL – BRASIL**

SÃO PAULO
2023

BEATRIZ REGINA RODRIGUES CARVALHO

**OCORRÊNCIA DE *Encephalitozoon intestinalis* EM
TAMANDUÁ BANDEIRA (*Myrmecophaga tridactyla*) E TATUS
(*Priodontes maximus*, *Euphractus sexcinctus*, *Cabassous u.
squamicaudis*) DO MATO GROSSO DO SUL – BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Maria Anete Lallo

SÃO PAULO
2023

Carvalho, Beatriz Regina Rodrigues.

Ocorrência de *Encephalitozoon intestinalis* em tamanduá bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) e tatus (*Priodontes maximus*, *Euphractus sexcinctus*, *Cabassous u. squamicaudis*) do Mato Grosso do Sul – Brasil / Beatriz Regina Rodrigues Carvalho. - 2023.

32 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2023.

Área de concentração: Patologia Integrada e Translacional.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Anete Lallo.

1. Microsporidia. 2. Xenarthra. 3. Saúde única. 4. Zoonose. I. Lallo, Maria Anete (orientadora). II. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

“Dedico este trabalho aos meus avós maternos, “*In Memoriam*”, e a minha família, pois sem eles este trabalho e muitos dos meus sonhos não se realizariam.”

OCORRÊNCIA DE *Encephalitozoon intestinalis* EM TAMANDUÁ BANDEIRA (*Myrmecophaga tridactyla*) E TATUS (*Priodontes maximus*, *Euphractus sexcinctus*, *Cabassous u. squamicaudis*) DO MATO GROSSO DO SUL – BRASIL

Beatriz Regina Rodrigues Carvalho¹, Ronalda Silva de Araujo², Danilo Kluyber^{3,4}, Arnaud Léonard Jean Desbiez⁴, Maiara G. Caiaffa⁴, Maria Anete Lallo¹.

¹Programa de Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista (UNIP), Rua Doutor Bacelar, 1212, São Paulo, SP, 04026-002, Brasil;

²CETESB-Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, Avenida Prof. Frederico Hermann Júnior, 345, São Paulo, SP, 05459900, Brasil.

³Naples Zoo at the Caribbean Gardens, Florida, Estados Unidos.

⁴ICAS - Instituto de Conservação de Animais Silvestres, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

1 **Resumo**

2 Os microsporídios são fungos emergentes e oportunistas que infectam uma população
3 excepcionalmente diversa de vertebrados e invertebrados. Existem 17 espécies de
4 microsporídios potencialmente zoonóticas identificadas em animais domésticos e silvestres. Os
5 mamíferos da ordem Xenarthra podem abrigar e transmitir diversos patógenos, atuando como
6 importantes fontes de infecção para a disseminação de diversas zoonoses. Como os
7 microsporídios ainda não foram descritos nesse grupo de animais, o objetivo desse estudo foi
8 analisar a ocorrência dos microsporídios zoonóticos *Encephalitozoon cuniculi*,
9 *Encephalitozoon intestinalis* e *Enterocytozoon bieneusi* em as fezes de tamanduá bandeira
10 (*Myrmecophaga tridactyla*) e espécies de tatus (*Priodontes maximus*, *Euphractus sexcinctus*,
11 *Dasypus novemcinctus*, *Cabassous u. squamicaudis*) monitoradas pelo ICAS - Instituto de
12 Conservação de Animais Silvestres. Amostras fecais (n=127) foram submetidas ao tratamento
13 de choque térmico (frio e calor) e depois submetidas à extração de DNA com o Kit de extração

14 QIAamp fast DNA Stool Mini Kit. A amplificação do material genético do patógeno foi feita
15 pela reação em cadeia de polimerase (PCR) com *primers* genéricos e o produto gerado a partir
16 desta reação foi submetido a Nested PCR com *primers* espécie específicos (EBIEF1/EBIER1
17 para *E. bieneusi*; ECUNF/ECUNR para *E. cuniculi* e SINTF/SINTR para *E. Intestinalis*). Onze
18 amostras foram positiva para *E. intestinalis*, sendo duas de tamanduá bandeira (2/56, 3,8%),
19 uma de *Priodontes maximus* (1/11, 9%), sete de *Euphractus sexcinctus* (7/57, 13,7%) e uma
20 de *Cabassous u. squamicaudis* (1/3, 33,3%). Houve predomínio de resultados positivos em
21 animais adultos, de ambos os sexos e nos biomas do Pantanal e do Cerrado na região estudada.
22 Concluimos que a prevalência em Xenarthra foi 8,66%, com maior ocorrência em tatus do que
23 em tamanduás. A prevalência nas espécies de tatus foi, em ordem decrescente, maior no tatu do
24 rabo mole, depois no tatu peba e por fim no tatu canastra. Portanto, as espécies de mamíferos
25 silvestres aqui estudadas, tamanduás e especialmente tatus, devem ser consideradas como
26 reservatórios do patógeno e com papel relevante em saúde única.

27

28 **Palavras-chave:** Microsporidia, Microsporidioses, Xenarthra, Saúde Única, Zoonose.

29

30 **Occurrence of *Encephalitozoon intestinalis* In Giant Anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*)**
31 **And Armadillos (*Priodontes maximus*, *Euphractus sexcinctus*, *Cabassous u. squamicaudis*)**
32 **From Mato Grosso Do Sul – Brazil**

33 **Abstract**

34 Microsporidia are emerging, opportunistic fungi that infect an exceptionally diverse population
35 of vertebrates and invertebrates. There are 17 potentially zoonotic species identified in domestic
36 and wild animals. Mammals of the order Xenarthra can harbor and transmit several pathogens,
37 acting as important sources of infection for the spread of various zoonoses. As microsporidia
38 have not yet been described in this group of animals, the aim of this study was to analyze the

39 occurrence of the zoonotic microsporidia *Encephalitozoon cuniculi*, *E. intestinalis* and
40 *Enterocytozoon bieneusi* in the feces of giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) and
41 armadillo species (*Priodontes maximus*, *Euphractus sexcinctus*, *Dasypus novemcinctus*,
42 *Cabassous u. squamicaudis*) monitored by ICAS - Institute for the Conservation of Wild
43 Animals. Fecal samples (n=127) were subjected to thermal shock treatment (cold and heat) and
44 then subjected to DNA extraction with the QIAamp fast DNA Stool Mini Kit Extraction Kit.
45 Amplification by polymerase chain reaction (PCR) was performed with generic primers and
46 the product generated from this reaction was subjected to Nested PCR with specific primers:
47 EBIEF1/EBIER1 for *E. bieneusi*; ECUNF/ECUNR for *E. cuniculi* and SINTF/SINTR for *E.*
48 *intestinalis*. Eleven samples tested positive for *E. intestinalis*, two from giant anteater (2/56,
49 3.8%), one from *Priodontes maximus* (1/11, 9%), seven from *Euphractus sexcinctus* (7/57,
50 13.7%) and one from *Cabassous u. squamicaudis* (1/3, 33.3%). There was a predominance of
51 positive results in adult animals, of both sexes and in the Pantanal and Cerrado biomes. We
52 concluded that the prevalence in Xenarthra was 8.66%, with a higher occurrence in armadillos
53 than in anteaters. The prevalence in armadillo species was, in descending order, higher in the
54 soft-tailed armadillo, then in the peba armadillo and finally in the giant armadillo. Therefore,
55 the species of wild mammals studied here, anteaters and especially armadillos, must be
56 considered as reservoirs of the pathogen and with a relevant role in one health.

57

58 **Keywords:** Microsporidia, Microsporidiosis, Xenarthra, One health, Zoonosis.

59

60	Sumário	
61	1. Introdução.....	9
62	2. Métodos	12
63	2.1. Amostras.....	12
64	2.2. Extração de DNA.....	13
65	2.3 Amplificação do DNA pela reação em cadeia pela polimerase dupla (Nested PCR)	14
66	2.4. Eletroforese em gel de Agarose.....	15
67	3. Resultados e Discussão.....	16
68	4. Conclusão	22
69	5. Agradecimentos	24
70	Referências	25
71		
72		

73 1. Introdução

74

75 O filo Microsporidia compreende mais de 220 gêneros e 1.700 espécies de fungos
76 oportunistas, intracelulares obrigatórios, que infectam uma ampla gama de hospedeiros
77 vertebrados e invertebrados, estando presente em todos os biomas (Magalhães et al., 2022; Ruan
78 et al., 2021; Stentiford et al., 2019). A principal via de transmissão é oro-fecal por meio de
79 esporos, forma infectante, liberados pelos hospedeiros ao longo do ciclo biológico. Os esporos
80 possuem uma parede quitinosa espessa, conferindo a esse patógeno resistência às adversidades
81 do ambiente (Han et al., 2021; Magalhães et al., 2022).

82 Algumas espécies de microsporídios que infectam humanos também são capazes de
83 infectar outros animais, dando respaldo à transmissão zoonótica, embora a mesma não tenha
84 sido comprovada para todas as espécies de microsporídios (Qiu et al., 2019; Santín and Fayer,
85 2011; Vahedi et al., 2020). O risco da transmissão dos animais para o homem está ligado ao
86 contato próximo com animais silvestres ou domésticos, de estimação ou criação infectados,
87 assim como pela exposição à água, alimentos ou aerossóis contendo esporos de microsporídios
88 (Santín and Fayer, 2011). Entre os 17 microsporídios zoonóticos descritos, *Enterocytozoon*
89 *bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem* e *Encephalitozoon cuniculi* são
90 as espécies mais comumente relatadas nas infecções de mamíferos (Qiu et al., 2019; Santín et
91 al., 2018). Na microsporidiose humana, a apresentação clínica está relacionada à espécie de
92 microsporídio envolvida e ao *status* imunológico, sendo frequentemente caracterizada por
93 diarreia crônica e emaciação, embora ceratoconjuntivite, hepatite, miosite, infecção renal e
94 urogenital, ascite e/ou colangite também tenham sido relatadas, particularmente em indivíduos
95 imunocomprometidos (Han et al., 2021).

96 Os esporos de microsporídios liberados por hospedeiros infectados pelas fezes, urina ou
97 estão presente nas carcaças de animais infectados e podem ser dispersos pela água e por

98 alimentos. A detecção de diferentes espécies de microsporídios zoonóticos em águas
99 superficiais de abastecimento municipal (Izquierdo et al., 2011), efluentes hospitalares (Jiang
100 et al., 2020), efluentes de esgoto terciário e águas subterrâneas (Dowd et al., 2003; Jiang et al.,
101 2020) corroboram para a veiculação hídrica desses fungos. Adicionalmente, foram observados
102 relatos de detecção de esporos em alimentos (Javanmard et al., 2018; Stentiford et al., 2016).

103 O caráter zoonótico de algumas espécies de microsporídio no ambiente demonstra sua
104 importância dentro do contexto de saúde única, que aborda a importância da saúde animal,
105 ambiental e humana, formando uma rede de conexões interdependente que podem garantir a
106 saúde de todos os elos envolvidos (Mazet et al., 2009).

107 As populações humanas e animais estão cada vez mais vulneráveis a novos agentes
108 patogênicos como resultado de vários fatores ambientais que causam disruptiva nos
109 ecossistemas. Um exemplo é o aumento do desmatamento, desencadeando a destruição e
110 fragmentação de diversos habitats, favorecendo a emergência de doenças. Esse impacto na
111 saúde é o resultado da aproximação de animais silvestres com a populações humana e de
112 animais domésticos, o que favorece a emergência de doenças em todos os níveis (Povill et al.,
113 2018). Ainda é relevante considerar inúmeros fatores que determinam o comprometimento da
114 resposta imunitária e torna os hospedeiros mais suscetíveis (Zanella, 2016)

115 *E. bienersi* é o microsporídio mais encontrado na população humana e nos animais
116 silvestres, sendo descrito em lince, lobo, raposa vermelha, javali, lagomorfos, roedores,
117 cervos, guaxinins (Amer et al., 2019; Dashti et al., 2022; Figueiredo et al., 2023; Ni et al.,
118 2021; Zhang et al., 2018); nos animais de produção, foi observada prevalência de 59,3% da
119 espécie *E. bienersi* em suínos (Fiuza et al., 2015), 17,5% em bovinos (Da Silva Fiuza et al.,
120 2016), 19,2% em carneiros (Fiuza et al., 2016) e 15,9% em frangos (Da Cunha et al., 2016).
121 Essa mesma espécie de microsporídio foi encontrada em gatos domésticos (3,3%) (Prado et
122 al., 2019). No Brasil, foi demonstrada a ocorrência de microsporídios em animais silvestres,

123 sendo os achados referentes fezes de quatis do parque ecológico de São Paulo (Lallo et
124 al.,2010). Contudo, são escassas as informações sobre outros animais silvestres e outras
125 espécies de microsporídios patogênicos, fato que motivou essa pesquisa.

126 O Mato Grosso do Sul é um estado com grande diversidade em termos de
127 fitofisionomias, abrangendo três biomas Neotropicais distintos: Cerrado; Mata Atlântica;
128 Pantanal; conseqüentemente apresenta elevada diversidade faunística (Da Silva et al., 2010).
129 Nesses biomas, coexistem animais silvestres, domésticos e populações humanas, sendo a área
130 recortada por uma malha rodoviária do estado é de 13.258,9 km em 142 rodovias. O projeto
131 Bandeiras e Rodovias foi criado para entender a alta taxa de mortalidade de tamanduás-
132 bandeira e reduzir as colisões veiculares com a fauna nas rodovias do Mato Grosso do Sul
133 (ICAS, 2023). Esse projeto abrange 19 trechos de 16 rodovias, considerando como prioridades
134 o monitoramento de áreas de maior abundância de fauna, locais com alto índice de
135 atropelamento ou travessia de animais, trechos da rodovia que tangenciam ou que interceptam
136 áreas de conservação, zonas úmidas, terras indígenas e quilombolas; áreas remanescentes de
137 vegetação nativa; área com corpos de água, áreas de reprodução, dessedentação e dispersão
138 de animais silvestres; áreas com ocorrência de espécies ameaçadas; áreas com potencial
139 agrícola e áreas urbanas.

140 O tamanduá-bandeira é um mamífero sul-americano listado como vulnerável à extinção
141 pelas União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN, 2022), sendo a espécie animal
142 escolhida para denominar o projeto Bandeiras e Rodovias. O tatu canastra, a maior espécie de
143 tatu, também foi incorporado ao grupo estudado por estar descrito como espécie vulnerável na
144 lista vermelha da IUCN e ser encontrado na área do cerrado e Pantanal. Diante da
145 vulnerabilidade dessas duas espécies de mamíferos e de sua importância para os biomas
146 brasileiros, o objetivo deste trabalho foi analisar a ocorrência dos microsporídios zoonóticos
147 *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon intestinalis*, e *Enterocytozoon bieneusi* nas fezes de

148 tatus e tamanduá bandeira monitorados pelo Projeto Bandeiras e Rodovias no estado do Mato
149 Grosso do Sul.

150

151 **2. Métodos**

152 **2.1. Amostras**

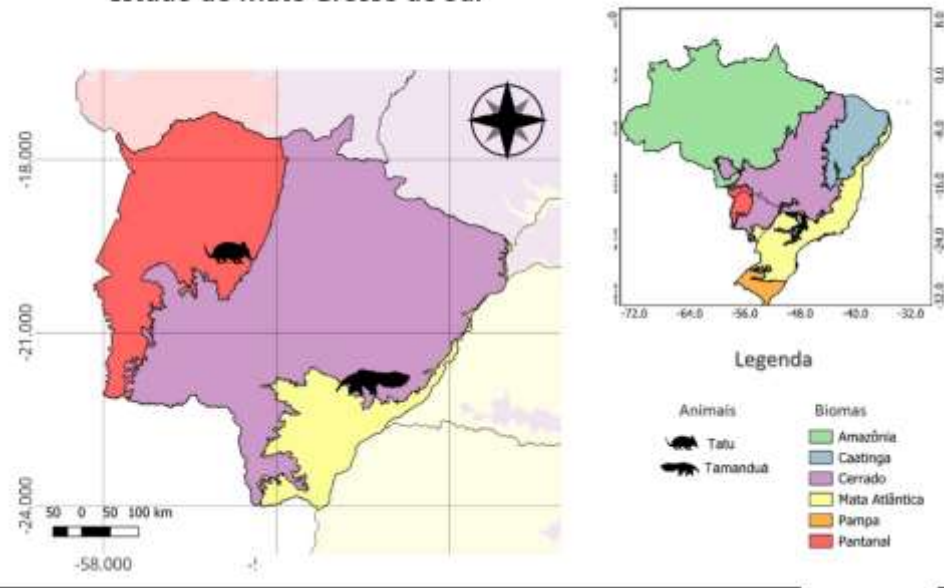
153 Amostras fecais de *Myrmecophaga tridáctila* (n=56), *Priodontes maximus* (n=11),
154 *Euphractus sexcinctus* (n=51), *Dasypus novemcinctus* (n=06) e *Cabassous u. squamicaudis*
155 (n=03) foram doadas pelo Instituto de Conservação de Animais Silvestres (ICAS), localizado
156 em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, com as seguintes coordenadas geográficas:
157 Latitude: 7° 36' 0" Sul, Longitude: 37° 48' 0" Oeste. Essas amostras, pertencentes à animais de
158 vida livre dos biomas Cerrado e Pantanal (Figura 1), foram coletadas por veterinários
159 responsáveis pelo plano de conservação, realizado com periodicidade mensal de abril a
160 dezembro nos anos de 2022 e 2023, sustentado pelo projeto Bandeiras e Rodovias e Programa
161 de Conservação do Tatu-Canastra. Ambos os projetos de pesquisa ocorrem sob as licenças
162 aprovadas e emitidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade –
163 ICMBIO, sob os números 27587-15 e 53798. A coleta foi realizada após a anestesia destes animais,
164 diretamente do reto de cada indivíduo. As amostras de fezes foram colocadas em tubos de coleta sem
165 conservante e congeladas a -20°C, por no máximo quatro semanas. No Centro de Pesquisas da
166 Universidade Paulista (UNIP), campus Indianópolis, também foram mantidas sob as mesmas
167 condições de refrigeração e descongeladas no dia da extração.

168 Ao total foram coletadas e analisadas 127 amostras de 5 distintas espécies, de ambos os
169 sexos, sendo filhotes, jovens e adultos (Quadro 1).

170

171

Localização dos animais de estudo do Mato Grosso do Sul



172

173 **Figura 1.** Mapa do Brasil evidenciando o estado do Mato Grosso do Sul, com delimitação dos
174 biomas e localização aproximada dos animais analisados.

175

176 2.2. Extração de DNA

177 As amostras fecais individualizadas foram descongeladas e 220 mg separadas em tubos
178 com capacidade de 2 mL. Em seguida, foram submetidas a extração do DNA total, por meio do
179 *kit* comercial *QIAamp fast DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) e processadas de
180 acordo com as instruções do fabricante. Foi realizado um tratamento prévio de aquecimento a
181 95°C por cinco minutos em banho-maria e congelamento por cinco minutos em gelo seco (YU
182 et al., 2008). O DNA extraído foi armazenado a -20C até a amplificação pela PCR.

183

184

185

186 **Quadro 1.** Espécies de mamíferos pertencentes as amostras coletadas, sexo e idade dos
 187 indivíduos.

Espécie	Nome popular	Número por sexo	Número por idade	Número total de amostras analisadas
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá bandeira	26 machos	19 filhotes	56
		30 fêmeas	18 jovens	
			19 adultos	
<i>Euphractus sexcinctus</i>	Tatu peba	30 machos	01 filhote	51
		21 fêmeas	03 jovens	
			47 adultos	
<i>Priodontes maximus</i>	Tatu canastra	02 machos	01 filhote	11
		09 fêmeas	10 adultos	
<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Tatu galinha	04 machos	06 adultos	06
		02 fêmeas		
<i>Cabassous u. Squamicaudis</i>	Tatu do rabo mole	02 machos	03 adultos	03
		01 fêmeas		

188

189 **2.3 Amplificação do DNA pela reação em cadeia pela polimerase dupla (Nested PCR)**

190 Na primeira PCR foram utilizados os *primers* genéricos *Forward* e *Reverse*
 191 amplificando um fragmento de 1216 pb. Em seguida, foram utilizados *primers* específicos para
 192 a identificação das principais espécies de microsporídios conforme descritos no Quadro 2. A
 193 primeira PCR foi realizada com volume final de 25 µL cada, contendo: 5 µL de DNA, 13,5 µL
 194 de água ultrapura q.s.p, 5 µL de tampão 5X (contendo 1,5 mM de MgCl₂), 0,2 mM de cada
 195 deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen™), 0,3 µM de cada
 196 *primer* (Exxtend do Brasil) e 1,25U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega). O volume de 3,0
 197 µL da primeira PCR foi transferido para novos tubos e submetidos à segunda reação utilizando
 198 os *primers* espécie-específicos.

199 A primeira e segunda PCR foram incubadas em termociclador (Mastercycler gradient,
 200 Eppendorf), e submetidas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos;

201 seguida de 35 ciclos de amplificação compostos de desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto;
 202 anelamento a 55°C por 1 minuto; extensão por 60 segundos; e extensão final á 95°C por 10
 203 minutos.

204

205 **Quadro 2.** *Primers* utilizados para o diagnóstico de microsporídios através da PCR.

Microsporídios	Tamanho do fragmento (pb)	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')	Referência
Genérico		CACCAGCTTGATTCTGCC	GACGGGCGGTGTGTACA	Da Silva et al., 1997
GENF/GENR	1216 pbs	TG	AAG	
<i>Enterocytozoon</i>		GAAACTTGTCCACTCCCT	CCATGCACCCACTCCTG	Da Silva et al., 1996
<i>bieneusi</i>	607 pbs	TACG	CCATT	
EBIEF1/ EBIER1				
<i>Encephalitozoon</i>		ATGAGAAGTGATGTGTG	TGCCATGCACTCACAGG	De Grote et al, 1995
<i>cuniculi</i>	549 pbs	TGCG	CATC	
ECUNF/ECUNR				
<i>Encephalitozoon</i>		TATGAGAAGTGACTTTTT	CCGTCCTCGTTCTCCTGC	Da Silva et al., 1997
<i>Intestinalis</i>	520 pbs	TTC	CCG	
ISINTF/SINTR				

206

207 **2.4. Eletroforese em gel de Agarose**

208 As amostras amplificadas na segunda PCR foram coradas com 0,5 uL de SYBR™ Safe
 209 (Invitrogen™) e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Amersham Bioscience),
 210 sob intensidade de corrente de 6v/cm. O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação
 211 com o marcador de peso molecular 100bp Plus DNA Ladder (Invitrogen™). O gel foi
 212 visualizado em fonte de luz ultravioleta (Life Technologies™).

213 3. Resultados e Discussão

214 Das 127 amostras fecais de tamanduás e tatus 8,66% (11/127), foram positivas para
215 microsporídios, sendo todas as amostras positivas da espécie de *E. intestinalis* (Tabela 1).
216 Inicialmente, esse microsporídio era conhecido como *Septata intestinalis* (Cali et al., 1993;
217 Hartskeerl et al., 1995), porém análises moleculares mostraram que pertence ao gênero
218 *Encephalitozoon*.

219 *Encephalitozoon* é a espécie de microsporídio mais prevalente em seres humanos e tem
220 os enterócitos como célula-alvo causando diarreia em indivíduos imunocompetentes e
221 imunocomprometidos. Em pacientes com doença de Crohn, *E. intestinalis* pode ter prevalência
222 de até 30% (Andreu-Ballester et al., 2013), mostrando a importância desse microsporídio
223 associado às doenças que causam imunossupressão. Particularmente em indivíduos
224 imunodeficientes, especialmente com AIDS avançada, a infecção por *E. intestinalis* pode levar
225 a enterite grave com disseminação para os rins e o trato hepatobiliar (Cali et al., 1993; El Fakhry
226 et al., 2001; Hamamci et al., 2015; Raynaud et al., 1998; Van Gool et al., 1997). A maioria dos
227 estudos envolvendo mamíferos silvestres, a espécie *E. bienersi* é mais frequente (Galván-Díaz
228 et al., 2014; Li & Xiao, 2021), no presente estudo foi detectado, pela primeira vez, *E.*
229 *intestinalis*, nas fezes de *Myrmecophaga tridáctyla*, *Euphractus sexcinctus*, *Priodontes*
230 *maximus* e *Cabassous u. Squamicaudis*. Diante a importância zoonótica dessa espécie de
231 microsporídio, esses resultados são de extrema relevância e mostra a necessidade de incluir essa
232 espécie de microsporídio nos estudos epidemiológicos.

233

234

235

236

237 **Quadro 3.** Distribuição das amostras coletadas e analisadas pela espécie de mamífero, total de
 238 amostras analisadas pela espécie, número de amostras positivas para *Encephalitozoon*
 239 *intestinalis* e percentual dentro da espécie de hospedeiro e microsporídeo identificado.

Espécie de mamífero	Número absoluto de amostras analisadas	Número de amostras positivas	Percentual (%) de amostras positivas relativo à espécie de mamífero	Espécie de microsporídeo identificada
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	56	2	3,8	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>
<i>Cabassous u. Squamicaudis</i>	3	1	33,3	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>
<i>Priodontes maximus</i>	11	1	9,0	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>
<i>Euphractus sexcinctus</i>	51	7	13,7	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>
<i>Dasybus novemcinctus</i>	6	0	0	-

240

241 *Myrmecophaga tridactyla* (Pilosa: Myrmecophagidae) é uma espécie vulnerável e ameaçada
 242 de extinção. No Brasil, é considerada possivelmente extinta nos estados do Rio de Janeiro, Espírito
 243 Santo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e com risco significativo de desaparecimento na América
 244 Central (Miranda et al., 2014). O surgimento de um patógeno para uma espécie em extinção oferece
 245 uma ameaça potencial à conservação, causando preocupação quanto a preservação desta espécie.
 246 Assim, a ocorrência de microsporídios em tamanduá passa a ser um fator preocupante.

247 Ao discriminar os mamíferos analisados, a prevalência de *E. intestinalis* em *Myrmecophaga*
 248 *tridactyla* foi de 3,8% (2/56) (Quadro 3, Figura 2A, 2B, 2C). Como não existem descrições anteriores,
 249 considerando-se mamíferos silvestres como base de comparação, resultado semelhante foi

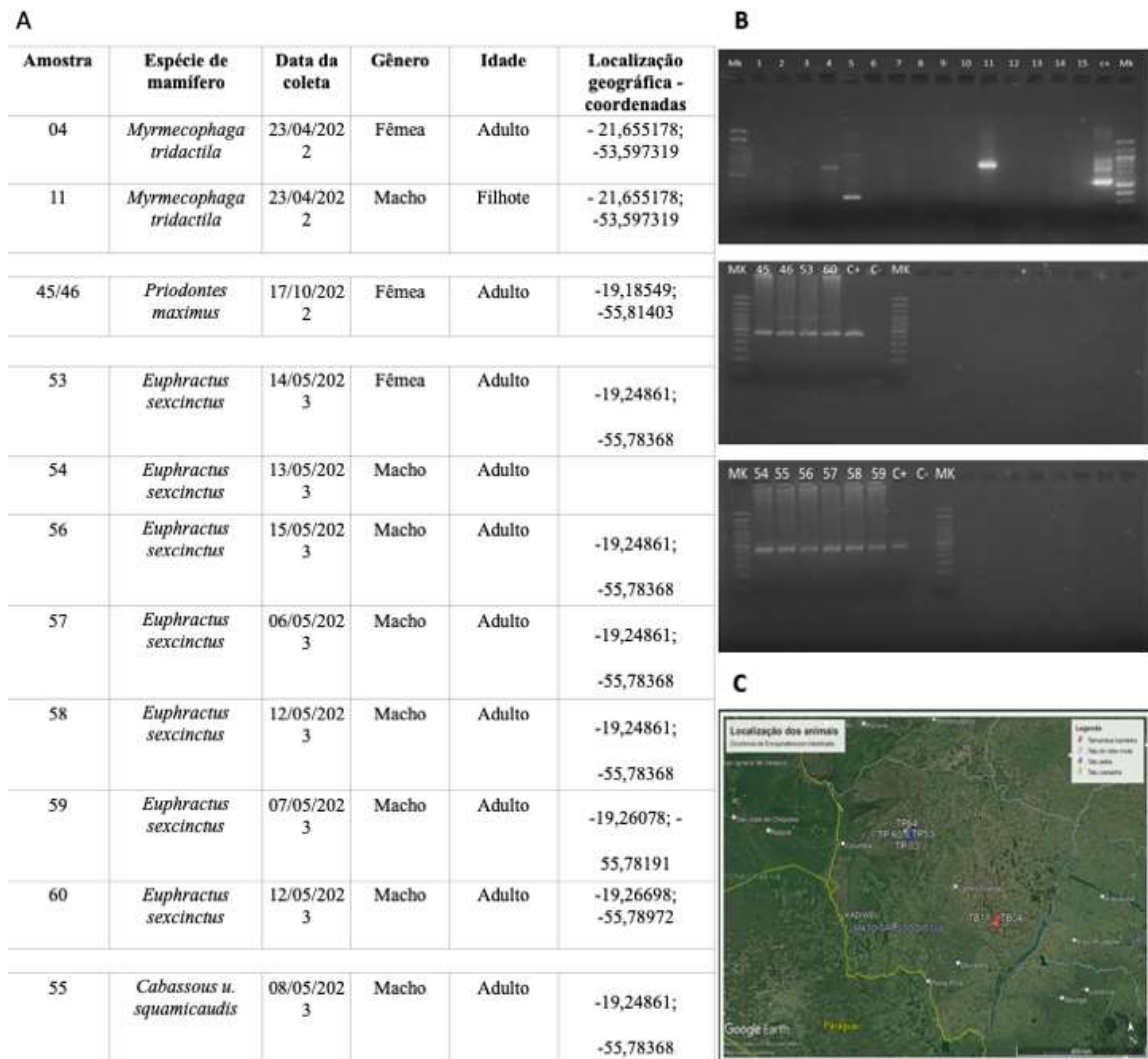
250 identificado em pandas (4%, 8/198), porém o estudo utilizou *primers* genéricos para *Encephalitozoon*
251 (Yang et al., 2023). Arenales et al. (2020) descreveram diversos patógenos que acometem tamanduá
252 bandeira, abrangendo infecções bacterianas, virais e fúngicas e, mais recentemente, foi descrito o
253 primeiro caso de infecção natural por SARS-CoV-2 nesse mamífero (Pereira et al., 2022).

254 Adicionalmente, um achado raro e importante foi que as duas amostras positivas para
255 *E. intestinalis* pertenciam a uma fêmea e o seu filhote. As fêmeas de tamanduá bandeira
256 geralmente têm um único filhote por gestação com um longo período de cuidado parental, sendo
257 que o filhote permanece no dorso da mãe por 6 a 9 meses até adquirir independência.
258 Inicialmente sua alimentação é baseada na amamentação, porém à medida que cresce, começa
259 a adotar os hábitos alimentares da mãe (Medri et al., 2011). Assim, podemos hipotetizar que
260 ambos se infectaram pela ingestão de esporos contaminantes na natureza na alimentação ou na
261 água. Contudo, um estudo experimental demonstrou a transmissão vertical pela transplacenta
262 em coelhas infectadas por *Encephalitozoon cuniculi* (Baneux, Pognan, 2003). Adicionalmente,
263 em raposas, cães domésticos e esquilos relata-se a transmissão transplacentária (vertical) como
264 um importante mecanismo de disseminação da doença, porém pouco explorado (Ruan et al.,
265 2021). Diante dos fatos relacionados à transmissão de microsporídios, não se pode descartar a
266 possibilidade de transmissão transplacentária entre a mãe e seu filhote.

267 Os tatus (ordem Cingulatas) possuem hábito de forrageamento alimentar diversificados
268 podendo se alimentar de formigas, cupins, frutos, pequenos vertebrados e até mesmo alimentos
269 em decomposição, o que os torna predispostos a se infectarem e serem reservatórios de diversos
270 patógenos (Capellão R.T. et al., 2015; Deps et al., 2003). São animais que escavam tocas para
271 se abrigarem e com isso são expostos a diversos patógenos existentes no solo como fungos,
272 outros animais também acabam fazendo uso de suas tocas e podem estar expostos aos agentes
273 zoonóticos (Souza, 2017).

274 Em tatus, a ocorrência de *E. intestinalis* foi de 12,67%, com 09 animais positivos entre
275 as 71 amostras pesquisadas (Quadro 3). Duas amostras fecais positivas, coletadas em períodos
276 diferentes, pertenciam a uma fêmea de tatu canastra da espécie *Priodontes maximus*, 7 amostras
277 positivas eram procedentes de tatus pebas *Euphractus sexcinctus* e 1 de tatu do rabo mole
278 *Cabassous u. squamicaudis* (Figura 2A, 2B, 2C). Outras zoonoses já foram identificadas em
279 tatus, como por exemplo, coccidioidomicose, hanseníase, toxoplasmose e doença de Chagas,
280 as quais podem ser transmitidas para outros mamíferos e ao homem, pelo consumo da carne do
281 tatu, uso da carapaça para fazer adornos ou ainda o uso medicinal (Ferreira et al., 2021). Diante
282 dessa situação, reforçamos que a prevalência de *E. intestinalis* em tatus é um achado muito
283 preocupante considerando os aspectos zoonóticos já citados.

284 Nesse estudo, os tatus canastra estavam geograficamente localizados no bioma Pantanal
285 (Figura 2C), numa área mais preservada, sem grandes interferências urbanas, na mesma área
286 está localizado os tatus peba, tatu galinha e tatu do rabo mole, porém esses podem estar mais
287 próximos da sede da fazenda. Já os tamanduás estão no bioma Cerrado (Figura 2C), bioma mais
288 degradado, com grande interferência rural, onde compartilham dos mesmos corpos hídricos que
289 os demais animais da fazenda. Os microsporídios podem ser veiculados pela água o que
290 constitui uma das formas mais prováveis de disseminação da infecção (Prado & Sato, 2017).
291 Ainda, deve-se considerar o fato de que os tatus e os tamanduás, descritos neste trabalho,
292 compartilham de mananciais de uso comum aos animais da fazenda, podendo estas zoonoses
293 ser facilmente transmitidas para entre esses animais e a população humana que faz uso dos
294 recursos fornecidos por essa fazenda.



295

296 **Figura 2.** Dados adicionais de identificação dos animais positivos para *E. intestinalis*. A)
 297 Quadro com o número de identificação da amostra, a espécie de mamífero, data da coleta,
 298 gênero, idade e localização geográfica no momento da coleta. B) Registro fotográfico dos géis
 299 de agarose revelando positividade para *E. intestinalis*. C) Imagem via satélite, foto
 300 documentada em 25/10/2023 do Google Earth correspondendo à localização geográfica dos
 301 animais.

302 A pecuária extensiva é dominante, com estimativa de criação de 18.433.728 cabeças de
 303 gado em 2022 (IBGE, 2022). A pecuária ocorre nas regiões de coleta das amostras, o que representa
 304 uma situação de risco pelo contato próximo entre animais domésticos e silvestres. O microsporídeo *E.*

305 *bieneusi* já foi encontrado em 17,5% de amostras fecais de bovinos no estado do Rio de Janeiro, com
306 maior prevalência em bezerros com menos de 2 meses de idade (27,6%) e entre 3 e 8 meses de idade
307 (28,8%) versus novilhas (14,1%) e adultos (1,4%) (da Silva Fiuza et al., 2016). O estudo citado
308 revelou uma situação epidemiológica importante na bovinocultura brasileira com o microsporídios *E.*
309 *bieneusi*, portanto poderíamos hipotetizar que o gado possa ser fonte de infecção de outros
310 microsporídios para animais silvestres, como observado nessa pesquisa. Da Silva et al., (2008)
311 registraram a primeira ocorrência de *Cryptosporidium* sp em fezes de Tamanduá mirim
312 (*Tamandua tetradactyla*), associado ao quadro clínico de diarreia, causada pelo patógeno. Os
313 autores atribuíram a veiculação hídrica como via de transmissão e reforça a possibilidade de a
314 atividade pecuária ter sua participação, fato que reforça as suspeitas aqui descritas.

315 Os esporos de microsporídio possuem uma parede rígida contendo quitina, que os confere
316 maior resistência no meio ambiente (Taghipour et al., 2022), porém o que torna a extração de
317 seu DNA um desafio, pois não se rompe facilmente, fazendo-se necessária adoção de técnicas
318 alternativas e ou/suplementares para a extração do DNA. Nós utilizamos o pré-tratamento com
319 choque térmico, para melhoramento dos resultados obtidos. Das 127 amostras 8,66% positivas
320 para *E. intestinalis*, número que poder ser subestimado devido às características referidas da
321 parede dos esporos e a presença de vários inibidores de PCR nas amostras fecais de origem
322 ambiental, fatores que dificultam sua expressão gênica.

323 A técnica de PCR é o mais indicado e eficiente para a detecção de microsporídios intestinais
324 (Müller et al., 1999; Saigal et al., 2013), trazendo com sigo, além da identificação da espécie,
325 informações moleculares, que pode ser investigada através de seu sequenciamento. A nPCR,
326 com primers espécie-específico, utilizada neste estudo, permite maior sensibilidade e
327 especificidade dos resultados obtidos (Bonin and Dotti, 2011).

328 O conhecimento das moléstias que acometem mamíferos silvestres é fundamental por
329 distintos aspectos. O comprometimento da saúde de animais infectados com a presença ou não

330 de quadros clínicos relacionados e, portanto, a questão de conservação do mamífero envolvido,
331 os quais muitas vezes já estão em risco, ou são espécies ameaçadas. Outra questão relevante de
332 saúde única é o encontro de patógenos zoonóticos, como os microsporídios, tornando animais
333 infectados fontes do patógeno na natureza, fenômeno de risco para a ocorrência de epidemias.
334 *Myrmecophaga tridactyla* assim como o *Periodontes maximus* sofrem constantemente com a
335 perda acelerada de seu habitat (Desbiez et al., 2022), levando-o a lista de animais vulneráveis
336 a extinção pela IUCN (2022) e em risco de extinção na maioria dos estados brasileiros
337 (ICMBIO, 2018) essas espécies já se encontram no plano de manejo para a proteção e
338 preservação, sendo assim, conhecer suas zoonoses corrobora com medidas cautelares para sua
339 preservação. As zoonoses podem ser exemplos didáticos no contexto de saúde única, sendo
340 possível observar os 3 pilares envolvidos, ambiental, humana e animal (Deps et al., 2003).
341 Como os microsporídios são patógenos emergentes de interesse global, ampliar o conhecimento
342 de sua circulação no meio ambiente é fundamental para conhecer a epidemiologia desses
343 patógenos e proposição de medidas mitigatórias visando a saúde única, uma vez que a
344 disseminação da infecção em todos os biomas pode ser dar pelo consumo de água e alimentos
345 contaminados (Stentiford et al., 2016).

346 Até a presente descrição não há relatos da presença das espécies de microsporídios nas
347 fezes dos animais envolvidos na amostragem deste estudo, fato que demonstra a relevância dos
348 nossos resultados, em especial pela questão zoonótica da espécie identificada.

349

350 **4. Conclusão**

351 Para finalizar, concluímos que a prevalência em *Xenarthra* foi 8,66%, com maior
352 ocorrência em tatus (12,67%) do que em tamanduá bandeira (3,8%). Entre as espécies de tatus
353 incluídas na amostragem, em ordem decrescente observamos com maior ocorrência tatu do rabo
354 mole (*Cabassous u. squamicaudis*, 33,3%), tatu peba (*Euphractus sexcinctus*, 13,7%) e tatu

355 canastra (*Priodontes maximus*, 9%). Portanto, essas espécies de mamíferos devem ser
356 consideradas como fontes de infecção do patógeno e com papel relevante em saúde única.

357

358 **5. Agradecimentos**

359 Ao Instituto de Conservação de Animais Silvestres – ICAS, Projeto Bandeiras e Rodovias e
360 Programa de Conservação do Tatu Canastra, pela parceria e doação das amostras.

361

362 **6. Financiamento**

363 Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
364 – CAPS pela concessão da bolsa PROSUP. Número do processo 88887.804490/2023-00.

365 **Referências**

- 366 Amer, S., Kim, S., Han, J.-I., Na, K.-J., 2019. Prevalence and genotypes of *Enterocytozoon*
367 *bieneusi* in wildlife in Korea: a public health concern. *Parasit Vectors* 12, 160.
368 <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3427-6>
- 369 Andreu-Ballester, J.C., Garcia-Ballesteros, C., Amigo, V., Ballester, F., Gil-Borrás, R.,
370 Catalán-Serra, I., Magnet, A., Fenoy, S., Aguila, C. del, Ferrando-Marco, J., Cuéllar,
371 C., 2013. Microsporidia and Its Relation to Crohn's Disease. A Retrospective Study.
372 *PLoS One* 8, e62107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062107>
- 373 Arenales, A., Gardiner, C.H., Miranda, F.R., Dutra, K.S., Oliveira, A.R., Mol, J.P., Teixeira
374 da Costa, M. EL, Tinoco, H.P., Coelho, C.M., Silva, R.O., Pinto, H.A., Hoppe, E.G.,
375 Werther, K., Santos, R.L., 2020. Pathology of Free-Ranging and Captive Brazilian
376 Anteaters. *J Comp Pathol* 180, 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2020.08.007>
- 377 Baneux, P.J.R., Pognan, F., 2003. *In utero* transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain
378 type I in rabbits. *Lab Anim* 37, 132–138.
379 <https://doi.org/10.1258/00236770360563778>
- 380 Bonin, S., Dotti, I., 2011. Nested-PCR, in: *Guidelines for Molecular Analysis in Archive*
381 *Tissues*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 111–114.
382 https://doi.org/10.1007/978-3-642-17890-0_22
- 383 Cali, A., Kotler, D.P., Orenstain, J.M., 1993. *Septata Intestinalis* N. G., N. Sp., an
384 Intestinal Microsporidian Associated With Chronic Diarrhea and Dissemination In
385 Aids Patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 40, 101–112.
386 <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04889.x>
- 387 Capellão R.T., Lazar, A., Bonvicio C.R., 2015. Infecção natural por agentes zoonóticos
388 em tatus (Mammalia: Cingulata) na América do Sul. *Bol. Soc. Bras. Mastozool.*

389 Da Cunha, M.J.R., Cury, M.C., Santín, M., 2016. Widespread presence of human-
390 pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in chickens. *Vet Parasitol* 217, 108–
391 12. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.019>

392 Da Silva A.S, Soares C.D.M, Gressler L.T, Lara V.M, Carregaro A.B, Monteiro S.G.,
393 2008. Criptosporidíase gastrintestinal em tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*).
394 *Rev. Bras. Zootecias* 10.

395 Da Silva Fiuza, V.R., Lopes, C.W.G., de Oliveira, F.C.R., Fayer, R., Santin, M., 2016.
396 New findings of *Enterocytozoon bieneusi* in beef and dairy cattle in Brazil. *Vet*
397 *Parasitol* 216, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.008>

398 Da Silva, M.A., Da Silva, J.D.S.V., Ferrari, D.L., Augusto, R., Lamparelli, C., 2010.
399 *Vegetação natural e área antrópica em Mato Grosso do Sul até o ano de 2002.*

400 Dashti, A., Santín, M., Köster, P.C., Bailo, B., Ortega, S., Imaña, E., Habela, M.Á., Rivero-
401 Juárez, A., Vicente, J., WE&H group, Arnal, M.C., de Luco, D.F., Morrondo, P.,
402 Armenteros, J.A., Balseiro, A., Cardona, G.A., Martínez-Carrasco, C., Ortiz, J.A.,
403 Calero-Bernal, R., Carmena, D., González-Barrio, D., 2022. Zoonotic
404 *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in free-ranging and farmed wild ungulates in
405 Spain. *Med Mycol* 60. <https://doi.org/10.1093/mmy/myac070>

406 Deps, P.D., Faria, L.V., Gonçalves, V.C., Silva, D.A., Ventura, C.G., Zandonade, E., 2003.
407 Aspectos epidemiológicos da transmissão da hanseníase em relação a exposição ao
408 tatu. *Hansenologia Internationalis: hanseníase e outras doenças infecciosas* 28, 138–
409 144. <https://doi.org/10.47878/hi.2003.v28.36392>

410 Dowd, S.E., John, D., Eliopolus, J., Gerba, C.P., Naranjo, J., Klein, R., López, B., de
411 Mejía, M., Mendoza, C.E., Pepper, I.L., 2003. Confirmed detection of *Cyclospora*
412 *cayetanesis*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* in water used
413 for drinking. *J Water Health* 1, 117–23.

414 El Fakhry, Y., Achbarou, A., Franetich, J., Desportes-Livage, I., Mazier, D., 2001.
415 Dissemination of *Encephalitozoon intestinalis*, a causative agent of human
416 microsporidiosis, in IFN- γ receptor knockout mice. *Parasite Immunol* 23, 19–25.
417 <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00351.x>

418 Ferreira, I.M., Salla, P. de F., Pacheco, S.M., 2021. Caça, manipulação e consumo de tatu
419 (mammalia: cingulata) e o risco de zoonoses / Hunting, handling and consumption of
420 tatu (mammalia: cingulata) and the risk of zoonoses. *Brazilian Journal of*
421 *Development* 7, 71236–71241. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n7-346>

422 Figueiredo, A.M., Dashti, A., Santín, M., Köster, P.C., Torres, R.T., Fonseca, C.,
423 Mysterud, A., Carvalho, J., Sarmiento, P., Neves, N., Hipólito, D., Palmeira, J.D.,
424 Teixeira, D., Lima, C., Calero-Bernal, R., Carmena, D., 2023. Occurrence and
425 molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in wild and domestic animal
426 species in Portugal. *Med Mycol* 61. <https://doi.org/10.1093/mmy/myad018>

427 Fiuza, V.R. da S., Lopes, C.W.G., Cosendey, R.I.J., de Oliveira, F.C.R., Fayer, R., Santín,
428 M., 2016. Zoonotic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes found in brazilian sheep. *Res*
429 *Vet Sci* 107, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.06.006>

430 Fiuza, V.R.S., Oliveira, F.C.R., Fayer, R., Santín, M., 2015. First report of *Enterocytozoon*
431 *bieneusi* in pigs in Brazil. *Parasitol Int* 64, 18–23.
432 <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.01.002>

433 Galván-Díaz, A.L., Magnet, A., Fenoy, S., Henriques-Gil, N., Haro, M., Gordo, F.P.,
434 Millán, J., Miró, G., del Águila, C., Izquierdo, F., 2014. Microsporidia detection and
435 genotyping study of human pathogenic *E. bieneusi* in animals from Spain. *PLoS One*
436 9, e92289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092289>

437 Hamamci, B., Çetinkaya, Ü., Berk, V., Kaynar, L., Kuk, S., Yazar, S., 2015. Prevalence
438 of *Encephalitozoon intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in Cancer Patients
439 Under Chemotherapy. *Mikrobiyol Bul* 49, 105–113. <https://doi.org/10.5578/mb.8787>
440 Han, B., Pan, G., Weiss, L.M., 2021. Microsporidiosis in Humans. *Clin Microbiol Rev* 34,
441 e0001020. <https://doi.org/10.1128/CMR.00010-20>
442 Hartskeerl, R.A., Van Gool, T., Schuitema, A.R.J., Didier, E.S., Terpstra, W.J., 1995.
443 Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata*
444 *intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon*
445 *intestinalis*. *Parasitology* 110, 277–285.
446 <https://doi.org/10.1017/S0031182000080860>
447 IBGE, 2022. Rebanho de Bovinos (Bois e Vacas) [WWW Document]. URL
448 [https://www.gov.br/icmbio/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-](https://www.gov.br/icmbio/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-diversas/livro_vermelho_2018_vol2.pdf)
449 [diversas/livro_vermelho_2018_vol2.pdf](https://www.gov.br/icmbio/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-diversas/livro_vermelho_2018_vol2.pdf) (accessed 12.4.23).
450 ICAS, 2023. Projeto Bandeiras e Rodovias [WWW Document]. URL
451 <https://www.icasconservation.org.br/projetos/bandeiras-e-rodovias/> (accessed
452 1.18.24).
453 ICMBIO, 2018. Instituto Chico Mendes De Conservacao Da Biodiversidade: Livro
454 Vermelho [WWW Document]. URL [https://www.gov.br/icmbio/pt-br/centrais-de-](https://www.gov.br/icmbio/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-diversas/livro_vermelho_2018_vol2.pdf)
455 [conteudo/publicacoes/publicacoes-diversas/livro_vermelho_2018_vol2.pdf](https://www.gov.br/icmbio/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-diversas/livro_vermelho_2018_vol2.pdf)
456 (accessed 12.4.23).
457 IUCN, 2022. The Iucn Red List Of Threatened Species [WWW Document]. URL
458 <https://www.iucnredlist.org/> (accessed 12.4.23).
459 Izquierdo, F., Castro Hermida, J.A., Fenoy, S., Mezo, M., González-Warleta, M., del
460 Aguila, C., 2011. Detection of microsporidia in drinking water, wastewater and

461 recreational rivers. *Water Res* 45, 4837–43.
462 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.06.033>

463 Javanmard, E., Mirjalali, H., Niyiyati, M., Jalilzadeh, E., Seyed Tabaei, S.J., Asadzadeh
464 Aghdaei, H., Nazemalhosseini-Mojarad, E., Zali, M.R., 2018. Molecular and
465 phylogenetic evidences of dispersion of human-infecting microsporidia to vegetable
466 farms via irrigation with treated wastewater: One-year follow up. *Int J Hyg Environ*
467 *Health* 221, 642–651. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.03.007>

468 Jean Desbiez, A.L., Kluyber, D., Massocato, G.F., Barreto, L.M., Attias, N., 2022. O que
469 sabemos sobre os tatus do Pantanal? Revisão do conhecimento sobre ecologia,
470 biologia, morfologia, saúde, conservação, distribuição e métodos de estudo. *Boletim*
471 *do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais* 17, 11–69.
472 <https://doi.org/10.46357/bcnaturais.v17i1.834>

473 Jiang, W., Roellig, D.M., Li, N., Wang, L., Guo, Y., Feng, Y., Xiao, L., 2020. Contribution
474 of hospitals to the occurrence of enteric protists in urban wastewater. *Parasitol Res*
475 119, 3033–3040. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06834-w>

476 Lallo, M.A., Calábria, P., Milanello, ; Liliane, Fernandes Bondan, ; Eduardo, n.d. *Revista*
477 *Saúde Ocorrência de microsporídios nas fezes de quatis (Nasua nasua).*

478 Li, W., Xiao, L., 2021. Ecological and public health significance of *Enterocytozoon*
479 *bieneusi*. *One Health* 12, 100209. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100209>

480 Magalhães, T.R., Pinto, F.F., Queiroga, F.L., 2022. A multidisciplinary review about
481 *Encephalitozoon cuniculi* in a One Health perspective. *Parasitol Res* 121, 2463–2479.
482 <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07562-z>

483 Mazet, J.A.K., Clifford, D.L., Coppolillo, P.B., Deolalikar, A.B., Erickson, J.D., Kazwala,
484 R.R., 2009. A “one health” approach to address emerging zoonoses: the HALI project
485 in Tanzania. *PLoS Med* 6, e1000190. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000190>

486 Medri, I.M., Mourão, G.D.M., Rodrigues, F.H.G., 2011. Ordem Pilosa. Mamíferos do
487 Brasil 2, 91–106.

488 Miranda, F., Bertassoni, A.&, Abba, A.M., 2014. *Myrmecophaga tridactyla*. The IUCN
489 Red List of Threatened Species. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014>

490 Müller, A., Stellermann, K., Hartmann, P., Schrappe, M., Fätkenheuer, G., Salzberger, B.,
491 Diehl, V., Franzen, C., 1999. A Powerful DNA Extraction Method and PCR for
492 Detection of Microsporidia in Clinical Stool Specimens. *Clinical Diagnostic*
493 *Laboratory Immunology* 6, 243–246. <https://doi.org/10.1128/CDLI.6.2.243->
494 [246.1999](https://doi.org/10.1128/CDLI.6.2.243-246.1999)

495 Ni, H.-B., Sun, Y.-Z., Qin, S.-Y., Wang, Y.-C., Zhao, Q., Sun, Z.-Y., Zhang, M., Yang,
496 D., Feng, Z.-H., Guan, Z.-H., Qiu, H.-Y., Wang, H.-X., Xue, N.-Y., Sun, H.-T., 2021.
497 Molecular Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* Infection
498 in Wild Rodents From Six Provinces in China. *Front Cell Infect Microbiol* 11,
499 783508. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.783508>

500 Pereira, A.H.B., Pereira, G.O., Borges, J.C., de Barros Silva, V.L., Pereira, B.H.M.,
501 Morgado, T.O., da Silva Cavasani, J.P., Shlessarenko, R.D., Campos, R.P., Biondo,
502 A.W., de Carvalho Mendes, R., Néspoli, P.E.B., de Souza, M.A., Colodel, E.M.,
503 Ubiali, D.G., Dutra, V., Nakazato, L., 2022. A Novel Host of an Emerging Disease:
504 SARS-CoV-2 Infection in a Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) Kept Under
505 Clinical Care in Brazil. *Ecohealth* 19, 458–462. <https://doi.org/10.1007/s10393-022->
506 [01623-6](https://doi.org/10.1007/s10393-022-01623-6)

507 Prado, J.B.F., Ramos, C.A. do N., Fiuza, V.R. da S., Terra, V.J.B., 2019. Occurrence of
508 zoonotic *Enterocytozoon bieneusi* in cats in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 28, 80–
509 90. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180096>

510 Prado, T., Sato, M.I.Z., 2017. Impactos das mudanças ambientais globais e desastres sobre
511 a epidemiologia das doenças de veiculação hídrica no Brasil, in: Reduction of
512 Vulnerability to Disasters: From Knowledge to Action. Reduction of vulnerability to
513 disasters: from knowledge to action, p. 377.

514 Raynaud, L., Delbac, F., Broussolle, V., Rabodonirina, M., Girault, V., Wallon, M.,
515 Cozon, G., Vivares, C.P., Peyron, F., 1998. Identification of *Encephalitozoon*
516 *intestinalis* in Travelers with Chronic Diarrhea by Specific PCR Amplification. J Clin
517 Microbiol 36, 37–40. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.1.37-40.1998>

518 Ruan, Y., Xu, X., He, Q., Li, L., Guo, J., Bao, J., Pan, G., Li, T., Zhou, Z., 2021. The
519 largest meta-analysis on the global prevalence of microsporidia in mammals, avian
520 and water provides insights into the epidemic features of these ubiquitous pathogens.
521 Parasit Vectors 14, 186. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04700-x>

522 Saigal, K., Khurana, S., Sharma, A., Sehgal, R., Malla, N., 2013. Comparison of staining
523 techniques and multiplex nested PCR for diagnosis of intestinal microsporidiosis.
524 Diagn Microbiol Infect Dis 77, 248–249.
525 <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.004>

526 Souza, D.K. de, 2017. Avaliação da prevalência de patógenos zoonóticos de importância
527 para a saúde pública em tatus de vida livre - Mato Grosso do Sul - Brasil.
528 Universidade de São Paulo, São Paulo. [https://doi.org/10.11606/D.99.2017.tde-](https://doi.org/10.11606/D.99.2017.tde-24012017-081133)
529 [24012017-081133](https://doi.org/10.11606/D.99.2017.tde-24012017-081133)

530 Stentiford, G.D., Bass, D., Williams, B.A.P., 2019. Ultimate opportunists—The emergent
531 Enterocytozoon group Microsporidia. PLoS Pathog 15, e1007668.
532 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007668>

533 Stentiford, G.D., Becnel, J.J., Weiss, L.M., Keeling, P.J., Didier, E.S., Williams, B.-A.P.,
534 Bjornson, S., Kent, M.-L., Freeman, M.A., Brown, M.J.F., Troemel, E.-R., Roesel,

535 K., Sokolova, Y., Snowden, K.F., Solter, L., 2016. Microsporidia - Emergent
536 Pathogens in the Global Food Chain. *Trends Parasitol* 32, 336–348.
537 <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.004>

538 Taghipour, A., Bahadory, S., Abdoli, A., Javanmard, E., 2022. A Systematic Review and
539 Meta-analysis on the Global Molecular Epidemiology of Microsporidia Infection
540 Among Rodents: A Serious Threat to Public Health. *Acta Parasitol* 67, 18–30.
541 <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00447-8>

542 Van Gool, T., Vetter, J.C.M., Weinmayr, B., Van Dam, A., Derouin, F., Dankert, J., 1997.
543 High Seroprevalence of *Encephalitozoon* Species in Immunocompetent Subjects. *J*
544 *Infect Dis* 175, 1020–1024. <https://doi.org/10.1086/513963>

545 Yang, J., Zeng, Y., Li, C., Liu, S., Meng, W., Zhang, W., He, M., Wang, L., Zuo, Z., Yue,
546 C., Li, D., Peng, G., 2023. Occurrence and Molecular Characteristics of
547 Microsporidia in Captive Red Pandas (*Ailurus fulgens*) in China. *Animals (Basel)* 13.
548 <https://doi.org/10.3390/ani13111864>

549 Zanella, J.R.C., 2016. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde
550 e produção animal. *Pesqui Agropecu Bras* 51, 510–519.
551 <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500011>

552 Zhang, Y., Koehler, A. V, Wang, T., Haydon, S.R., Gasser, R.B., 2018. First detection and
553 genetic characterisation of *Enterocytozoon bieneusi* in wild deer in Melbourne’s
554 water catchments in Australia. *Parasit Vectors* 11, 2. [https://doi.org/10.1186/s13071-](https://doi.org/10.1186/s13071-017-2577-7)
555 [017-2577-7](https://doi.org/10.1186/s13071-017-2577-7)

556