

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**RAFAEL QUIRINO MOREIRA**

**PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO VOADORES NO VALE DO RIO  
PARANAÍBA, BRASIL: MANUTENÇÃO DE LEPTOSPIRAS  
PATOGENICAS E CARRAPATOS**

**UBERLÂNDIA**

**2018**

RAFAEL QUIRINO MOREIRA

PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO VOADORES NO VALE DO RIO PARANAÍBA,  
BRASIL: MANUTENÇÃO DE LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS E CARRAPATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima

UBERLÂNDIA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M838      Moreira, Rafael Quirino, 1984  
2018      Pequenos mamíferos não voadores no vale do rio Paranaíba, Brasil  
[recurso eletrônico] : manutenção de leptospiros patogênicos e carrapatos  
/ Rafael Quirino Moreira. - 2018.

Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.485>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Carrapato. 3. Ecologia. 4. Leptospirose em  
animais. I. Lima, Anna Monteiro Correia, , (Orient.) II. Universidade  
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias. III. Título.

CDU: 619



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Ata da defesa de **TESE DE DOUTORADO** junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: **TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/003/2018**

Data: **26/02/2018**

Discente: **Rafael Quirino Moreira** – Matrícula – 11313VET025

Título da Tese: **PEQUENOS MAMÍFEROS NÃO VOADORES NO VALE DO RIO PARANAÍBA, BRASIL: MANUTENÇÃO DE LEPTOSPIRAS PATOGENICAS E CARRAPATOS**

Área de concentração: **SAÚDE ANIMAL**

Linha de pesquisa: **CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA**

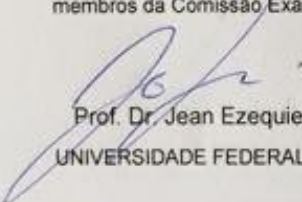
Projeto de Pesquisa de vinculação: **ESTUDOS DE EPIDEMIOLOGIA, DE NOVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO DE DOENÇAS BACTERIANAS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SELVAGENS**

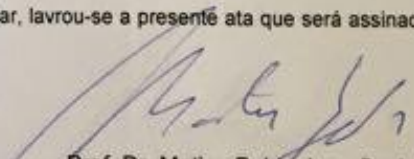
Aos 26 dias do mês de Fevereiro do ano de 2018 às 14:00 horas no Bloco 5 O – sala F – Campus Santa Mônica da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores/Doutores: **Jean Ezequiel Limongi – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; Matias Pablo Juan Szabó – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; Vanessa do Nascimento Ramos – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO; José Roberto Ferreira Alves Júnior – INSTITUTO FEDERAL GOIANO e Anna Monteiro Correia Lima orientador(a) do(a) candidato(a).**

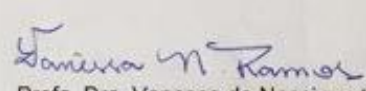
Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão Dr./Dra. Anna Monteiro Correia Lima concedeu a palavra ao/a candidato(a) para a exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para resposta. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a) **APROVADO**.


Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

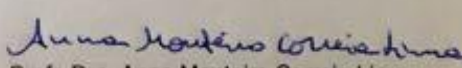
Os trabalhos foram encerrados às **18** horas e **45** minutos, e para constar, lavrou-se a presente ata que será assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 26 de fevereiro de 2018.

  
Prof. Dr. Jean Ezequiel Limongi  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

  
Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

  
Profa. Dra. Vanessa do Nascimento Ramos  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

  
Prof. Dr. José Roberto Ferreira Alves Júnior  
INSTITUTO FEDERAL GOIANO

  
Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima

ORIENTADORA

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

RAFAEL QUIRINO MOREIRA - Nascido em Goiânia, Estado de Goiás, em 07 de setembro de 1984, filho de Marcos Moreira Teixeira e Lúcia Helena Quirino Moreira. Médico Veterinário, graduado em fevereiro de 2007 pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Durante a graduação foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Graduação (PIBEG) no período de agosto de 2005 a julho de 2006 e participou como membro do Diretório Acadêmico Dr. Carlos de Almeida Wutke, do curso de Medicina Veterinária FAMEV-UFU de janeiro de 2005 a setembro de 2006. Em 2007 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração de Saúde Animal, no qual foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior no Programa de Reestruturação das Universidades Federais (CAPES-REUNI), de julho de 2008 a setembro de 2009, quando alcançou o título de mestre. No ano de 2008 ingressou no curso de especialização em Ovinocultura de Corte, pelo Instituto ReHagro, alcançando o título de especialista no ano de 2009. Em 2013 iniciou o doutorado na mesma instituição, na qual também foi bolsista durante o período de setembro de 2014 a setembro 2016 pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Foi professor nos cursos de Biomedicina e Medicina Veterinária da Universidade Presidente Antônio Carlos, na cidade de Uberlândia, entre os anos de 2012 e 2013. Desde 2015 é professor no curso de Medicina Veterinária do Instituto Master de Ensino Presidente Antônio Carlos em Araguari – MG. Tem experiência nas seguintes áreas: medicina veterinária preventiva; imunologia veterinária; doenças infecciosas; epidemiologia veterinária e saúde pública.

Sou grato por tudo, mas não vaidoso, as coisas da mente só têm um autor.  
Tal qual a aragem que ondula a campina, a onda serena que acalma e ensina,  
embora imperfeito a mim ilumina, a Graça Divina do meu Criador.

Poeta Goiá

*Aos meus pais que me deram liberdade pelo estudo,  
exemplos sólidos de generosidade, honestidade e justiça.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder a graça de tão boas e generosas experiências, amizades, parcerias e aprendizados durante o curso de doutorado. E por me presentear com a vida, me oferecendo a oportunidade de vivê-la entre os melhores familiares e amigos que uma pessoa poderia ter.

Aos meus pais Marcos e Lúcia, eternos apoiadores e fomentadores da minha educação, e mecenas de minhas aventuras acadêmicas. Obrigado por estarem sempre presentes, repletos de amor, carinho e cuidado. Tê-los por perto me faz mais corajoso, e inunda minha alma de alegria. O brilho de meu sorriso brota de seus corações.

Aos meus irmãos Paulo André e Juliana, que mesmo afastados por alguns quilômetros, estão sempre presentes no meu coração, e eternamente marcados na minha alma.

A todos meus familiares, pelo apoio e torcida de sempre. Obrigado inclusive àqueles já *in memoriam*, que lembro com tanto carinho, e que nos presentearam com o legado da alegria.

À minha terrinha tão amada, Goiandira, solo fértil que depositei minhas raízes e que ainda hoje sustenta meu crescimento pelo mundo. Essa cidade não é mais um lugar, mas um sentimento.

À minha querida amiga e orientadora Dra. Anna Monteiro Correia Lima, presente em minha formação acadêmica desde a graduação. Obrigado pela disponibilidade, atenção, apoio e tantos bons aconselhamentos. Me apoiarei sempre em seu exemplo de educadora, na construção de minha carreira profissional.

À família LADOC, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e de muito trabalho. Todos foram apoio imprescindível para a realização deste trabalho.

À amiga Vanessa Ramos pela generosidade de seus ensinamentos, e principalmente pela tão cara amizade que eu pude ser presenteado.

Ao Professor Mathias Pablo Juan Szabó, pela atenção e enorme contribuição com a captura de pequenos mamíferos.

Aos colegas do Labix, principalmente a Maria Marlene Martins, por toda a amizade e contribuição na realização deste trabalho.

Ao amigo Rodrigo e seus familiares, que nos acolheu generosamente em sua casa, e nos ofereceu sua propriedade rural em Guimarães para as campanhas de captura na região do Alto Paranaíba.

Ao amigo Vinícius Buiatte e seus familiares, pela acolhida e disponibilização de sua propriedade rural em Ipiaçu, para as campanhas de captura na região do Baixo Paranaíba.



Aos meus alunos e amigos, Samanta, Rogers, Alex, Maria de Fátima, Wesley, João Vitor, Érica, Isabela, Marcelo Pereira pela companhia nas viagens e auxílio nas coletas.

Aos amigos e colegas de pós-graduação André Antunes, Mariana Souza, Pollyanna Mafra, Danilo Mundim, Bruno Cabral, Andreia Zago, Juliana Januzzi, Danielle Vitorino, Carolina Osava, Géssica Franco, Carolina Nagib, Líria Hirano e Paula Borges que estiveram mais próximos apoiando e auxiliando na conclusão deste trabalho.

A todos os produtores rurais que nos receberam tão prontamente em suas propriedades para coleta de material biológico de bovinos.

Ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LADOC) da Universidade Federal de Uberlândia, por disponibilizar espaço físico e condições para que o projeto pudesse ser executado.

Ao Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense, na pessoa do professor Walter Lilenbaum, pela doação dos antígenos e pelo auxílio na realização dos exames de PCR.

Ao Laboratório de Zoologia de Vertebrados da ESALQ-USP pela identificação e classificação dos pequenos mamíferos capturados em gênero e espécie.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão do apoio financeiro.

Aos professores que aceitaram compor esta banca de defesa, Dra. Vanessa Nascimento Ramos, Dr. José Roberto Ferreira Alves Júnior, Dr. Jean Ezequiel Limongi, Dr. Matias Pablo Juan Szabó. Obrigado por aceitarem contribuir com este trabalho.

**Muito obrigado a todos!**

## RESUMO

O rio Paranaíba está localizado predominantemente no bioma Cerrado, com algumas manchas de Mata Atlântica. Os pequenos mamíferos são modelos aplicáveis no estudo de carrapatos e circulação de patógenos, inclusive em ambientes com diferentes graus de degradação. O presente estudo descreve as diferentes espécies de pequenos mamíferos não voadores no vale do rio Paranaíba, e a identificação destes como portadores renais de leptospirosas patogênicas; investiga o papel de pequenos mamíferos não voadores silvestres e sinantrópicos na ecologia da leptospirose em uma propriedade rural na região sudeste do estado de Goiás e avalia o papel desses animais como hospedeiros para carrapatos em áreas de Cerrado no vale do rio Paranaíba. Foram capturados 72 pequenos mamíferos não voadores de três espécies de marsupiais (36,1%, 38 espécimes) e oito espécies de roedores (63,9%, 46 espécimes). Do total, 24 (33,33%) estavam positivos à PCR do gene *lipL32* e apenas um espécime de marsupial, *Gracilinanus agilis*, foi reagente à técnica de aglutinação microscópica (MAT) para o sorovar Australis na diluição de 1/100. Frente a PCR, 10 roedores (34,48%) e 14 marsupiais (32,56%) foram positivos. Bovinos de propriedade na região sudeste do estado de Goiás reagiram principalmente para estirpes pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, adaptados às espécies de pequenos mamíferos. Do total de pequenos mamíferos capturados, apenas 14 espécimes, correspondentes aos gêneros *Nectomys*, *Cerradomys*, *Oecomys*, *Necomys* e *Gracilinanus* estavam infestados por carrapatos. A riqueza de carrapatos foi de pelo menos 04 espécies no Alto Paranaíba (*Ixodes* sp., *Ornithodoros* sp., *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma sculptum*), além de larvas de *Amblyomma* sp.; 02 no Médio Paranaíba (*Ornithodoros* sp. e *Amblyomma dubitatum*) e larvas de *Amblyomma* sp.; e apenas 01 no Baixo Paranaíba (*Ornithodoros* sp.). Pequenos mamíferos não voadores cumprem o papel de veiculadores de leptospirosas patogênicas no vale do rio Paranaíba. Este é o primeiro relato de identificação, via PCR, de *Gracilinanus agilis*, *Calomys* sp., *Hylaeamys megacephalus* e *Oecomys bicolor* como portadores renais e veiculadores de leptospirosas patogênicas. Pequenos mamíferos desempenham relevante papel na ecologia da leptospirose em propriedade rural produtora de leite, favorecendo a infecção de bovinos. Carrapatos do gênero *Ornithodoros* sp. foram encontrados parasitando apenas o didelfídeo *Gracilinanus agilis*. O carrapato da espécie *Amblyomma dubitatum* foi o de maior ocorrência em pequenos mamíferos do vale do rio Paranaíba e este parece ser o primeiro registro desta espécie em *Nectomys* sp. no bioma Cerrado. Como também o primeiro registro de *Ixodes loricatus* parasitando *Cerradomys* sp. e *Ixodes loricatus* em *Rhipidomys* sp. no Brasil.

Palavras-chave: Ecologia; *Gracilinanus agilis*; *lipL32*; Ecótono; *Amblyomma dubitatum*

## ABSTRACT

The Paranaíba's river is located predominantly without Cerrado biome, with some spots of Atlantic Forest. Small mammals are models and no study of ticks and circulation of pathogens, even in environments with different degrees of degradation. The present study describes the different species of small non-flying mammals in the Paranaíba River valley, and their identification as renal carriers of pathogenic leptospiras. Investigates the role of small non-flying wild and synanthropic mammals in the ecology of leptospirosis in a rural property in the southeastern region of the state of Goiás. In addition, evaluates the role of these animals as hosts for ticks in Cerrado areas, in the Paranaíba river valley. Seventy-two small non-flying mammals were captured from three species of marsupials and eight rodent species. Of these 72, 24 (33.33%) were positive for *lipL32* gene PCR and only one specimen, *Gracilinanus agilis*, was MAT reagent for serovar Australis. Among the marsupials, 14 (32.56%) were PCR positive, and 10 rodent specimens (34.48%) were diagnosed as renal carriers by the same technique. Cattle owned in the southeastern region of the state of Goiás reacted mainly to strains belonging to the serogroup Icterohaemorrhagiae, maintained by small mammals. Of the total of small mammals captured, ticks infested only 14 animals, corresponding to the genera *Nectomys*, *Cerradomys*, *Oecomys*, *Necomys* and *Gracilinanus*. The tick richness was at least 04 species in the Alto Paranaíba (*Ixodes* sp., *Ornithodoros* sp., *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma sculptum*) in addition to *Amblyomma* sp. 02 in the Middle Paranaíba (*Ornithodoros* sp. and *Amblyomma dubitatum*), and *Amblyomma* sp. and only 01 in the Low Paranaíba (*Ornithodoros* sp.). Small non-flying mammals play a role of pathogenic leptospire carriers in the Paranaíba river valley. This is the first report of PCR identification of *Gracilinanus agilis*, *Calomys* sp., *Hylaeamys megacephala* and *Oecomys bicolor* as renal carriers of pathogenic leptospire. Small mammals play a relevant role in the ecology of leptospirosis in rural dairy farms, favoring the infection of cattle. Ticks of the genus *Ornithodoros* sp. were found parasitizing only the didelid *Gracilinanus* sp. The *Ambliomma dubitatum* tick was the most frequent occurrence in small mammals in the Paranaíba river valley, and this seems to be the first record of this species in *Nectomys* sp. in the Cerrado biome. As well as the first, record of *Ixodes loricatus* parasitizing *Cerradomys* sp., and the first record of *Ixodes loricatus* in *Rhipidomys* sp. in Brazil.

**Keywords:** Ecology; *Gracilinanus agilis*; *lipL32*; Ecotone; *Amblyoma dubitatum*

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1.</b>	Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR do gene <i>lipL32</i> de <i>Leptospiras</i> patogênicas e reagentes ao MAT em suas respectivas áreas de captura, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.	51
<b>Tabela 2.</b>	Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR do gene <i>lipL32</i> de <i>Leptospiras</i> patogênicas em suas respectivas áreas e ambientes de captura, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.	53
<b>Tabela 3.</b>	Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR do gene <i>lipL32</i> de <i>Leptospiras</i> patogênicas em seus respectivos locais de instalação da armadilha, e estação do ano. Vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.	58
<b>Tabela 4.</b>	Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR do gene <i>lipL32</i> de <i>Leptospiras</i> patogênicas e ao MAT, em suas respectivas categorias sexual e etária, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.	59
<b>Tabela 5.</b>	Sucesso de captura de pequenos mamíferos não voadores em suas respectivas áreas e ambientes de captura, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.	60
<b>Quadro 1.</b>	Antígenos empregados na técnica de soroaglutinação microscópica (MAT), segundo a cepa, espécie, sorogrupo, sorovar, hospedeiro, instituição de origem e ano do isolamento.	49

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1.</b>	Frequência de bovinos reagentes ao MAT para leptospirose e suas respectivas categorias etária e sexual, Goiandira – GO, 2016.	89
<b>Tabela 2.</b>	Frequência de títulos de anticorpos (200; 400 e 800) por sorovares dentre os animais reagentes ao MAT (técnica da aglutinação microscópica) para <i>Leptospira</i> spp. em rebanho bovino, Goiandira – GO, 2016.	91
<b>Tabela 3.</b>	Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR de tecido renal para o gene <i>lipL32</i> de leptospiros patogênicas em seus respectivos ambientes de captura, local de instalação de armadilhas e mês de captura. Fazenda Mata da Fartura, Goiandira – GO, 2016.	94
<b>Quadro 1.</b>	Antígenos empregados na técnica de soroaglutinação microscópica (MAT), segundo a cepa, espécie, sorogrupo, sorovar, hospedeiro, instituição de origem e ano do isolamento.	88

### CAPÍTULO 4

<b>Tabela 1.</b>	Parâmetros de infestação para carrapatos em pequenos mamíferos capturados no ano de 2016, no vale do rio Paranaíba, Brasil, considerando a área de estudo, a espécie do hospedeiro e o ambiente de captura.	123
------------------	---	-----

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Distribuição espacial dos biomas Mata Atlântica e Cerrado, e localização dos pontos de coletas de pequenos mamíferos não voadores no vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016. 43
- Figura 2.** Matriz de cobertura vegetal dos pontos de coletas na região do vale do rio Paranaíba, municípios de Ipiacu-MG (Baixo Paranaíba), Goiandira-GO (Médio Paranaíba) e Guimarães-MG (Alto Paranaíba), 2016. 44
- Figura 3.** Distribuição de pequenos mamíferos não voadores capturados no Alto Paranaíba e positivos à PCR para o gene *lipL32* em seus respectivos ambientes de captura, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016. 54
- Figura 4.** Distribuição de pequenos mamíferos não voadores capturados no Médio Paranaíba e positivos à PCR para o gene *lipL32* em seus respectivos ambientes de captura, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016. 55
- Figura 5.** Distribuição de pequenos mamíferos não voadores capturados no Baixo Paranaíba e positivos à PCR para o gene *lipL32* em seus respectivos ambientes de captura, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016. 56

### CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Mapa do uso e ocupação do solo e transectos de captura de pequenos mamíferos não voadores. Fazenda Mata da Fartura, Goiandira - Goiás, Brasil, 2016. 83

<b>Figura 2.</b>	Distribuição de pequenos mamíferos capturados e positivos à PCR para o gene <i>lipL32</i> em seus respectivos ambientes de captura. Fazenda Mata da Fartura, Goiandira – GO, 2016.	95
------------------	--	----

#### **CAPÍTULO 4**

<b>Figura 1.</b>	Distribuição espacial dos biomas Mata Atlântica e Cerrado, e localização dos pontos de coletas de pequenos mamíferos não voadores no vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.	117
<b>Figura 2.</b>	Matriz de cobertura vegetal dos pontos de coletas na região do vale do rio Paranaíba, municípios de Ipiaçu-MG (Baixo Paranaíba), Goiandira-GO (Médio Paranaíba) e Guimarães-MG (Alto Paranaíba), 2016.	118

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: graus Celsius

*A: Amblyomma*

AA: Ambiente Antrópico

BOD: Demanda bioquímica de oxigênio

CEUA: Comissão de Ética na Utilização de Animais

Cl: Cloro

cm: centímetro

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTP: desoxinucleotideo trifosfatado

EMJH: Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris

FIOCRUZ: Fundação Osvaldo Cruz

FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

FR: Florestas Ribeirinhas

*G: Gracilinanus*

GO: Goiás

*I: Ixodes*

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

Kg: quilograma

Km²: quilômetro quadrado

L: litro

*L.: Leptospira*

L: larva



LPS: lipopolissacarídeos

MAT: Técnica da aglutinação microscópica

MG: Minas Gerais

mg: miligramas

Mg: magnésio

ml: mililitro

mm: milímetro

mM: milimol

*N: Nectomys*

N: ninfa

n: número

NR: Florestas Não-Ribeirinhas

OIE: Organização Mundial de Saúde Animal

OMS: Organização Mundial da Saúde

p: prevalência

pb: pares de bases

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

PS: Pasto Sujo

*R.: Rattus*

*R.: Rhipicephalus*

S: Sul

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

USP: Universidade Federal Paulista

W: Oeste

µl: microlitro

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Leptospira e leptospirose	17
1.2 Leptospirose em bovinos	18
1.3 Epidemiologia	19
1.4 Reservatórios	20
1.5 Diagnóstico para leptospirose	21
1.6 Carrapatos em pequenos mamíferos	24
1.7 Bioma Cerrado e a Bacia do Rio Paranaíba	24
1.8 Justificativas	25
1.9 Objetivos	27
CAPÍTULO 2 – Detecção de pequenos mamíferos portadores renais de leptospirosas patogênicas no vale do rio Paranaíba, Brasil	36
CAPÍTULO 3 – Papel dos pequenos mamíferos não voadores na manutenção e veiculação de leptospirosas patogênicas em rebanho bovino com leptospirose	76
CAPÍTULO 4 – Carrapatos de pequenos mamíferos do vale do rio Paranaíba, uma região de ecótono impactada por atividades agropecuárias	112
CONSIDERAÇÕES FINAIS	135

## **CAPÍTULO 1**

### **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Leptospira* e leptospirose

A leptospirose é uma doença cosmopolita de maior ocorrência em regiões quentes e úmidas, que favorecem a sobrevivência da bactéria no ambiente. É transmitida entre mamíferos por contato direto entre animais infectados e pela exposição a água, solo e alimentos contaminados com a urina de animais portadores renais de *Leptospira* spp. No Brasil, o endemismo dessa doença favorece a exposição da população humana a ambientes contaminados e animais infectados, tanto selvagens quanto sinantrópicos e domésticos, representando uma ameaça persistente a saúde (FAINE et al., 1999; LEVETT et al., 2015; DE SOUZA et al., 2016).

De caráter zoonótico, caracterizada pelo curso agudo entre os hospedeiros incidentais, e de curso crônico a subclínico entre os hospedeiros adaptados. Amplamente disseminada, de grande destaque no cenário mundial, causando graves prejuízos à saúde pública e à saúde animal. A presença em rebanhos comerciais implicam na diminuição da produtividade dos animais, e consequentemente na lucratividade na atividade pecuária (CALDAS, 1992; LANGONI et al., 2008; ELLIS, 2015).

As infecções por leptospirosas são classificadas em infecções incidentais e infecções por estirpes adaptadas aos hospedeiros. As infecções incidentais são causadas pelos sorovares não adaptados, como as infecções a partir de Copenhageni e Icterohaemorrhagiae (adaptados a roedores), Tarassovi e Pomona (associados a suínos) em bovinos. Já a outra forma de infecção está representada, por exemplo, pelos casos de leptospirose em bovinos causadas por sorovares do sorogrupo Sejroe, como Guaricura, Wolffi e Hardjo, nos seus genótipos Hardjobovis e Hardjoprajitno (LLANES; RESTREPO; RAJEEV, 2016; LOUREIRO et al., 2016; LUCCHESI et al., 2016; CORREIA; LOUREIRO; LILENBAUM, 2017).

Leptospirosas são espiroquetas, com aproximadamente 0,1 mm de diâmetro por 6 a 20 mm de comprimento, pertencentes à família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales. Possuem membrana composta de mosaico antigênico de lipopolissacarídeo (LPS), com aspecto estrutural e imunológico similar a outros microrganismos gram-negativos (PICARDEAU; BRENOT; GIRON SAINT, 2001). São bactérias aeróbias obrigatórias com temperatura ótima de crescimento entre 28 a 30°C (FAINE et al., 1999).

A classificação fenotípica da *Leptospira*, antes dividida em *Leptospira biflexa*, saprófitas e *Leptospira interrogans*, patogênicas, foi substituída por uma classificação genotípica. Durante muito tempo a espécie *Leptospira interrogans* era considerada a única que causava leptospirose. Atualmente a família Leptospiraceae está dividida em 13 espécies patogênicas, com mais de 260 sorovares (ADLER, 2014). A classificação dos sorovares é baseada na expressão dos epítomos superficiais em um mosaico de antígenos lipopolissacarídeos (LPS), enquanto a especificidade dos epítomos depende da sua composição e conformação dos açúcares. De acordo com Faine et al. (1999) as leptospirosas não são hospedeiro-específicas, porém, alguns sorovares parecem apresentar afinidade a algumas espécies de hospedeiro.

Com a classificação das espécies *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. e *Leptospira yanagawae* sp. nov., substituindo a nomenclatura de genomoespécies 1, 3, 4 e 5, respectivamente, têm-se 20 espécies genomicamente classificadas, sendo nove espécies patogênicas, cinco intermediárias e seis saprófitas (SMYTHE et al., 2013). Existem ainda mais de 300 sorovares distintos e 25 sorogrupos (PICARDEAU, 2013).

## 1.2 Leptospirose em Bovinos

No Brasil, em pesquisas mais recentes, a prevalência para leptospirose em bovinos variou heterogeneamente entre os estados da nação que já foram pesquisados. No estado de Goiás, de 4.571 amostras colhidas, 62,2% foram positivas para pelo menos um dos dezesseis sorovares testados de *Leptospira*, com predominância de aglutinações de mais de um sorovar (40,24%), seguidas principalmente pelos sorovares Wolffii (14,53%), Hardjo (12,70%), Grippotyphosa (10,55%) e Shermani (6,55%) (MARQUES et al., 2010). Em outras pesquisas, realizadas especificamente na região sudeste do estado, próximo ao rio Paranaíba, encontraram uma soroprevalência de 18,9% entre bovinos do município de Ipameri (PAIM et al., 2016) e 81,1% entre vacas de rebanhos com relatos de perdas reprodutivas no município de Goiandira (MOREIRA et al., 2010).

No estado de Minas gerais, entre 39.012 soros sanguíneos de bovinos provenientes de 398 municípios de Minas Gerais de 1980 a 2002, identificaram como sorovariedades mais frequentes: Hardjo (amostra Norma), 23,7%, Hardjo (OMS), 19,7%, Hardjo (Hardjobovis), 13,8%, e Wolffii, 13,2%, indicando o caráter não incidental da leptospirose nesse estado (ARAUJO et al., 2005).

Para os resultados nos estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo, observou-se uma leve semelhança, se comparado aos demais resultados soroepidemiológicos de outros estados do Brasil. No Mato Grosso do Sul 69,8% das amostras de soro foram reagentes ao teste de aglutinação microscópica (MAT), e São Paulo apresentou 49,4% de amostras positivas, ambos para um ou mais sorovares. Nestes casos, contudo, o sorovar Hardjo foi apontado como o mais prevalente, 65,6% e 46,0%, seguido do sorovar Wolffi, com 12,3% e 21,0%, respectivamente para os dois estados (CASTRO et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; MARQUES et al., 2010).

Em Santa Catarina e no Maranhão a soropositividade dos animais testados foi de 35%, sendo as respostas aos sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Hardjo e Wolffi os mais frequentes (SILVA et al., 2012; TOPAZIO et al., 2015). A mesma prevalência também foi observada no Paraná, entretanto, os anticorpos para o sorovar Hardjo foram observados em 54,7% das amostras (HASHIMOTO et al., 2012). Prevalência mais alta para leptospirose foi observada em estudo realizado no estado da Bahia com 77,9% de animais positivos, o sorovar Hardjo (Hadjoprajitno) foi o mais frequente (34,49%), seguido pelos sorovares Shermani e Wolffi (FIGUEIREDO et al., 2009).

### **1.3 Epidemiologia**

As leptospirosas dependem de condições especiais no meio ambiente para que se mantenham vivas, como umidade e pH neutro à levemente alcalino, podendo, porém sobreviver por um curto período em pH mais ácido e por até 03 meses em urina diluída com águas da chuva (AMATREDJO, 1975). Onde condições como estas são encontradas, a prevalência de infecção acidental em humanos é maior. Ambientes favoráveis para a sobrevivência de leptospirosas são menos importantes na epidemiologia dos hospedeiros de manutenção (ELLIS, 2015).

O ponto central da epidemiologia da leptospirose nos animais domésticos é o portador renal excretando leptospirosas no ambiente. A transmissão sexual também é importante nessas espécies. Em teoria, qualquer leptospirosa patogênica pode infectar qualquer espécie animal. Entretanto, apenas um pequeno número de sorovares é endêmico em qualquer região ou país. Além disso, a leptospirose é uma doença que mostra uma nidalidade natural, e cada sorovar tende a ser mantida em hospedeiros de manutenção específicos (ADLER, 2014).

Portanto, em qualquer região, uma espécie animal será infectada por sorovares mantidos por essa espécie ou por sorovares mantidos por outras espécies animais presentes na área. O relativo importância dessas infecções incidentais é determinada pela oportunidade que fatores sociais, gerenciais e ambientais predominantes proporcionam contato e transmissão de leptospiros de outras espécies. Tal como acontece com os seres humanos, infecções incidentais são mais comuns em climas quentes e úmidos, com saneamento inadequado, controle inadequado de rebanhos sistemas mistos de manejo de animais domésticos levando a condições que fornecer contaminação ambiental por uma gama diversa de cepas de *Leptospirae* para a sobrevivência máxima dessas estirpes no ambiente (ADLER, 2014).

Em humanos, a infecção por leptospiros pode ser causada por qualquer um dos sorovares patogênicos, o que torna complexo o estudo epidemiológico da doença (ELLIS, 2015). Diversas espécies de mamíferos servem de reservatórios para o agente e mantêm a transmissão da leptospirose na natureza. Como determinadas espécies de reservatórios costumam estar associadas a alguns sorovares, o conhecimento sobre quais são os reservatórios e os sorovares circulantes em uma região é essencial para o entendimento da epidemiologia da leptospirose no local (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2014).

O período de incubação médio após a infecção de um hospedeiro humano por leptospiros patogênicos é de 7 a 14 dias. A infecção é capaz de produzir uma grande variedade de manifestações clínicas, como uma infecção subclínica seguida de soroconversão, uma doença febril aguda autolimitada e a de uma doença grave e potencialmente letal que pode se apresentar por qualquer combinação entre insuficiência renal aguda, icterícia, sangramentos e pneumonite (BHARTI et al., 2003; MCBRIDE et al., 2005; LEVETT, 2014). A forma grave, que se manifesta por icterícia, insuficiência renal aguda e sangramento (síndrome de Weil) tem letalidade >10%. A forma grave associada a sangramento pulmonar maciço é conhecida como síndrome de hemorragia pulmonar grave (SHPS) e apresenta uma letalidade >50% (MCBRIDE et al., 2005; GOUVEIA et al., 2008).

## **1.4 Reservatórios**

### *1.4.1 Reservatórios Selvagens*

Existem três tipos de animais reservatórios de *Leptospira* spp., selvagens, os domésticos e os sinantrópicos. Os principais reservatórios selvagens são os pequenos mamíferos, os répteis e os anfíbios. Ainda não foi possível a identificação do papel das aves e dos insetos na manutenção e circulação de leptospiros, embora se acredite na sua possível contribuição na transmissão da leptospirose (FAINE et al., 1999).

O sorovar Australis foi isolado de rato-d'água (*Nectomys squamipes*), e os sorovares Bataviae, Ballum, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Castellonis apresentam como reservatórios espécies da família Didelphidae, representada pelos gambás (CORDEIRO et al., 1981; CORRÊA, 2007; LANGONI et al., 2008; JORGE et al., 2012).

Animais domésticos, após a fase septicêmica da doença, sofrem uma colonização dos túbulos renais pelas leptospiros remanescente à essa primeira fase, e esses animais começam a eliminar leptospiros, através da urina, constituindo a fase leptospiúrica. Nos reservatórios selvagens e sinantrópicos não existem registros dos animais que apresentam sinais clínicos da doença, no entanto, eles eliminam leptospiros no ambiente, por semanas, meses ou por toda a vida (ELLIS, 2015; SMYTHE et al., 2013).

#### 1.4.2 Roedores sinantrópicos

Dentre os reservatórios sinantrópicos os roedores são os reservatórios habituais das leptospiros no ambiente urbano. Acredita-se que entre os roedores sinantrópicos o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) tem o papel de maior risco com relação à transmissão da leptospirose no ambiente urbano já que numerosos estudos têm identificado esta espécie como o reservatório predominante de *Leptospira* na cercania dos domicílios de pessoas com a doença (VINETZ et al., 1996; PEZZELLA et al., 2004; FARIA et al., 2008; MATTHIAS et al., 2008).

Adicionalmente, os casos graves de leptospirose nas maiores cidades Brasileiras são causados predominantemente por um único sorovar *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni*, o qual está associado ao *R. norvegicus*, embora os ratos de esgoto estejam associados também à manutenção de outros sorovares do sorogrupo Icterohaemorrhagiae (KO et al., 1999; BAROCCHI et al., 2001; ROMERO; YASUDA, 2006).

### 1.5 Diagnóstico para leptospirose



### *1.5.1 Diagnóstico Indireto*

#### *1.5.1.1 MAT*

O MAT é o procedimento laboratorial mais utilizado para o diagnóstico de Leptospirose. É considerado o teste diagnóstico ouro para leptospirose pela Organização Mundial de Saúde (OMS), e pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (ELLIS, 2015; ADLER, 2014). Esse teste necessita de estirpes representativas dos principais sorogrupos conhecidos mais aqueles que são mantidos pelos animais reservatórios da região (ELLIS, 2015).

Baseia-se na identificação da aglutinação do soro do paciente com antígenos vivos em microscópio de campo escuro. O teste é considerado específico e sensível na fase imune da doença, permitindo a identificação do sorogrupo infectante, sendo uma importante ferramenta clínico-epidemiológica. Porém, o teste possui baixa sensibilidade na fase inicial da doença (CRODA et al., 2007), bem como em casos crônicos, onde os títulos de anticorpos podem ser muito baixos (ELLIS et al., 2015).

O MAT tem como desvantagem a não diferenciação de anticorpos vacinais daqueles produzidos pela infecção natural, embora os maiores títulos sejam indicativos desta última. Poucas reações falso-positivas ocorrem, já que os antígenos de superfície não são compartilhados com outros organismos. Porém, reações cruzadas causadas por exposição à leptospiras do mesmo sorogrupo podem ocorrer (SMITH et al., 1994).

A interpretação do MAT é complicada pela já citada reação cruzada entre sorovares, principalmente na fase inicial da doença, em que se tem uma maior concentração de IgM, um anticorpo menos específico que o IgG, e que pode aumentar as taxas de coagulações. Sendo assim, muitas vezes podem ocorrer títulos similares para todos os sorovares de um mesmo sorogrupo (LEVETT, 2014).

### *1.5.2 Diagnóstico Direto*

#### *1.5.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*

Consegue-se amplificar o DNA de *Leptospira* spp. a partir de soro, urina, humor aquoso, líquido e vários órgãos *pós-mortem* (LEVETT, 2014). Já foram descritos ensaios de PCR quantitativos com inúmeros genes alvo, entre eles o *lipL32*, próprio de leptospiras

patogênicas (MERIEN et al., 2005; PALANIAPPAN et al., 2005; AHMED et al., 2009; STODDARD et al., 2009). Outros genes comuns à leptospiros patogênicas, utilizados em ensaios de PCR são o *lig* e *lfb1* (AHMED et al., 2009). Em uma pesquisa realizada na Tailândia, de caso controle, numa população com alta prevalência, conseguiu-se comprovar que a técnica da PCR é mais sensível que o diagnóstico por isolamento (THAIPADUNPANIT et al., 2011). Entretanto, menos sensível que o Teste de Aglutinação Microscópica, caso não se tratar de uma espécie reservatório (BROWN et al., 1995).

Ensaio de PCR em tempo real geralmente são usados para quantificar a carga bacteriana de *Leptospira* spp. em tecidos, fluidos, excreções e secreções (SEGURA et al., 2005; AGAMPODI et al., 2012; TUBIANA et al., 2013). Uma limitação do diagnóstico baseado nesta técnica é a incapacidade de identificar o sorovar infectante, desta forma é uma ferramenta ainda limitada na vigilância epidemiológica de populações e áreas. A identificação do sorovar só é possível frente ao isolamento a partir de animais infectados ou portadores renais, embora acredita-se que essa identificação seja possível num futuro próximo (ADLER, 2014).

#### 1.5.2.4 Isolamento

As leptospiros requerem meios especializados para o isolamento, são de difícil recuperação, o que diminui a sensibilidade deste método diagnóstico direto. É possível recuperar leptospiros a partir do sangue de animais em fase de leptospiemia e, principalmente, de urina e tecido renal de animais na fase crônica de leptospiúria. As culturas de sangue devem ser iniciadas assim que for possível identificar os sinais clínicos clássicos ao curso agudo da doença (ADLER, 2014).

A urina pode ser cultivada a partir do início da segunda semana após aparecimento dos sinais clínicos. A duração da excreção urinária varia, mas pode ser de várias semanas a meses (BAL et al., 1994). A contaminação natural desta excreta dificulta o crescimento das leptospiros, devendo-se usar meios de cultura seletivos, com adição de antibióticos, para favorecer o crescimento dessas espiroquetas. As culturas são incubadas em 28-30° C e examinados semanalmente por microscopia de campo escuro, por até 16 semanas (MAGAJEVSKI et al., 2005; MIRAGLIA et al., 2003; ADLER, 2014).

As leptospiros isoladas são identificadas por métodos sorológicos, ou mais recentemente, por técnicas moleculares. Os métodos sorológicos necessitam de

anticorpos monoclonais padrão para sua realização. Entretanto, para a produção destes anticorpos, necessita-se de laboratórios especializados e com mão de obra capacitada. Anticorpos monoclonais estão disponíveis para identificação de muitos sorovares, mas não para todos, principalmente para os novos isolados (KROVER et al., 1988; ADLER, 2014).

## **1.6 Carrapatos em pequenos mamíferos**

Carrapatos estão entre os principais artrópodes vetores de patógenos que afetam humanos e animais (GUIMARÃES; TUCCI; BARROS-BATTISTI, 2001; JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Têm, portanto, grande impacto na saúde pública, pecuária e conservação da biodiversidade (CLEAVELAND; LAURENSEN; TAYLOR, 2001). Estão envolvidos na epidemiologia de doenças humanas importantes, como Doença de Lyme, Febre das Montanhas Rochosas e Febre Maculosa Brasileira (THORNER; WALKER; PETRI, 1998; OSTFELD; KEESING, 2000; SANGIONI et al., 2005).

A perda de habitat afeta as comunidades animais de forma muito variável, porém é comum que haja favorecimento de algumas espécies em detrimento de outras (ANDRÉN; ANDREN, 1994; BENNETT, 1990; BENDER; CONTRERAS; FAHRIG, 1998; BROOKS et al., 2002; BUCHMANN et al., 2013; JOHNSTONE; LILL; REINA, 2014; SCHLINKERT et al., 2016). Os grupos dos pequenos mamíferos não voadores, importantes hospedeiros de formas imaturas de carrapatos, e dos próprios carrapatos, como o *Amblyomma sculptum*, importantes vetores da febre maculosa no Brasil, são favorecidos por esses efeitos antropogênicos, como a perda de áreas florestadas, apresentando aumento de suas populações (OLIVER, 1989; GALVÃO et al., 2005; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

## **1.7 Bioma Cerrado e a bacia do rio Paranaíba**

O bioma Cerrado é o segundo maior do Brasil, cobrindo originalmente aproximadamente de 2 milhões de km<sup>2</sup>, o que corresponde a 23% do território do país (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997). Por ser uma área rica em espécies endêmicas e ameaçada por atividades humanas, é considerada um dos “hot spots” da biodiversidade global (CINCOTTA; WISNEWSKI; ENGELMAN, 2000).

Mais da metade de sua área original tornou-se pastagens e culturas anuais nos últimos 35 anos, restando apenas 20% da área original do bioma, dos quais somente 2,2% estão legalmente protegidos (MITTERMEIER et al., 1999). Estima-se que 20% das espécies de animais e plantas endêmicas do Cerrado, e ameaçadas de extinção, não ocorram nas áreas legalmente protegidas (KLINK et al., 2005). Isso chama a atenção para a importância da preservação de espécies também nessas áreas, que estão fora de parques e reservas ecológicas.

A Bacia do rio Paranaíba está predominantemente inserida no bioma Cerrado, entretanto se caracteriza por uma região de ecótono, devido a ocorrência também de manchas características de Mata Atlântica. Em função de atividades antrópicas, como a bovinocultura de leite, em apenas 21,8% de sua área total ainda resta vegetação nativa (ANA, 2013). Está localizada dentro de uma das bacias leiteiras com maior índice de produção no Brasil, extrapolando os 30 litros produzidos ao dia, para cada km<sup>2</sup> (EMBRAPA, 2015).

## **1.8 Justificativas**

No Brasil, os pequenos mamíferos não voadores detêm o maior número de espécies dentro da classe Mammalia. Esse grupo de animais é representado principalmente pelos roedores e marsupiais, que apresentam tanto espécies com ampla distribuição, quanto aquelas de ocorrência restrita a algumas áreas (FONSECA et al., 1996; EMMONS; FEER, 1997). Os pequenos mamíferos, tanto em suas espécies selvagens quanto nas sinantrópicas, já foram caracterizados como importantes reservatórios de sorovares patogênicos de leptospiros (CORDEIRO et al., 1981; FAINE et al., 1999; CORRÊA, 2007; LANGONI et al., 2008; JORGE et al., 2012; LEVETT, 2014; SOUZA et al., 2016), e também são considerados importantes hospedeiros para formas imaturas de carrapatos (OLIVER, 1989).

As zoonoses parecem estar associadas, em algum nível, a alterações no equilíbrio natural entre hospedeiros, vetores e patógenos. Nesse sentido, estudos ecológicos sobre a interação entre hospedeiros, vetores e agentes etiológicos, são relevantes para a compreensão mais aprofundada das consequências de alterações ambientais (OSTFELD; KEESING, 2000; LOGIUDICE et al., 2003; WIMBERLY et al., 2008) e elaboração de ações mitigadoras dos problemas resultantes dessas alterações (BROWNSTEIN; HOLFORD; FISH, 2003; PRUSINSKI et al., 2006).

Informações sobre a importância pequenos mamíferos não voadores na cadeia epidemiológica da leptospirose ainda são escassas, e até então não se identificou seu verdadeiro papel na manutenção e circulação de leptospiros no ambiente. A PCR, apesar de ser considerada uma técnica adequada para identificação de reservatórios, e indicada para o diagnóstico de portadores renais, até agora foi muito pouco usada em estudos epidemiológicos na América Latina (FARIA et al., 2008; VIEIRA, PINTO; LILENBAUM, 2017).

Os marsupiais dividem seu ambiente de vida com os roedores, desta forma são continuamente desafiados por patógenos e vetores comuns às duas espécies, e se infectam por contato indireto com este ambiente contaminado. Desta forma, se tornam importantes hospedeiros de *Leptospira* e carrapatos (CORDEIRO et al., 1981; FAINE et al., 1999; CORRÊA, 2007; LANGONI et al., 2008; JORGE et al., 2012; LEVETT, 2014; SOUZA, et al., 2016; FORNAZARI et al., 2018)

O risco da infecção por leptospiros, e parasitismo por carrapato depende da ecologia das espécies de hospedeiros, como a área de vida, comportamento de forrageamento e contato com outras espécies (FORNAZARI et al., 2018). Por isso pequenos mamíferos são modelos interessantes para estudos abrangendo carrapatos e patógenos, por serem importantes mantenedores de fases imaturas de carrapatos (GUGLIELMONE; NAVA, 2011) e de agentes infecciosos, como a *Leptospira*, no ambiente (LEVETT, 2014; ELLIS, 2015; FORNAZARI et al., 2018).

A importância econômica e a localização central da bacia do rio Paranaíba, a torna em uma área sujeita a forte e constante perda de habitat, com alterações que podem afetar todas as relações entre flora, fauna e microbiota associada. Assim, avaliar e acompanhar as interações entre todos os componentes da biodiversidade, nessa área, torna-se de grande valor regional e também global na compreensão da dinâmica dessas relações.

Em regiões que apresentem propriedades voltadas à atividade pecuária, nota-se a presença conjunta de fragmentos de mata, áreas de culturas perenes e anuais, e pastagens com diferentes graus de degradação. A atividade de bovinocultura, ao contrário das criações comerciais de aves e suínos, não se caracteriza pela aplicação de medidas rígidas de biossegurança, como o isolamento físico do ambiente desses animais. Os bovinos são uma espécie comercial criada em ambientes onde não se consegue restringir a presença de outras espécies domésticas, sinantrópicas e selvagens.

Desse modo, roedores selvagens do entorno podem ser atraídos para as proximidades das áreas de manejo, das pastagens, assim como podem interagir com os

roedores sinantrópicos (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*) que habitam comumente nesses sistemas, devido ao armazenamento de alimento e disponibilidade de abrigos (LEUNG; CLARK, 2005). Desta forma o fluxo de parasitas e/ou patógenos pode ser mantido e veiculado tanto pelos animais de produção, como pelos pequenos mamíferos selvagens e sinantrópicos (TIMM et al., 1987; KIJLSTRA et al., 2008; AKANDE, 2011; FARIÑA et al., 2012; BACKHANS et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013).

## 1.9 Objetivos

Esta pesquisa teve o objetivo de avaliar o potencial de roedores sinantrópicos e selvagens no fluxo de carrapatos e leptospiros patogênicas entre áreas de mata, pastagens, e ambientes com maior interferência antrópica (áreas de manejo de bovinos, paióis, silos, casas de máquinas, galinheiros, pocilgas e habitações rurais) no vale do rio Paranaíba.

### 1.9.2 Objetivos específicos

1. Investigar a circulação de leptospiros patogênicas em pequenos mamíferos não voadores com ocorrência no vale do rio Paranaíba.
2. Identificar o papel de pequenos mamíferos não voadores selvagens e sinantrópicos na ecologia da leptospirose, em uma propriedade rural da região sudeste do estado de Goiás, compreendida em área de cerrado sob influência atlântica.
3. Identificar sorovares comuns aos bovinos, em uma propriedade rural da região sudeste do estado de Goiás caracterizada com enzootia para leptospirose.
4. Avaliar pequenos mamíferos não voadores como hospedeiros para carrapatos em áreas de Cerrado com diferentes características de fragmentação no vale do rio Paranaíba, nos estados de Minas Gerais e Goiás.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. **Leptospira and leptospirosis**. [s.l.] Springer, 2014. v. 387

AGAMPODI, S. B.; MATTHIAS, M. A.; MORENO, A. C.; VINETZ, J. M. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: Association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 9, p. 1249–1255, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Plano de Recursos Hídricos e do Enquadramento dos Corpos Hídricos Superficiais da Bacia Hidrográfica do Rio Paranaíba**. [s.l: s.n.]; 2013.

AHMED, A.; ENGELBERTS, M. F.; BOER, K. R.; AHMED, N.; HARTSKEERL, R. A. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. e7093, 2009.

AKANDE, O. A. **A study on wild rat behaviour and control on a pig farm**. [s.l.] Swedish University of Agricultural Sciences, 2011.

AMATREDJO, A. Bovine Leptospirosis. **The Veterinary Bulletin**, v. 43, n. 12, p. 875–891, 1975.

ANDRÉN, H.; ANDREN, H. Effects of Habitat Fragmentation on Birds and Mammals in Landscapes with Different Proportions of Suitable Habitat: A Review. **Oikos**, v. 71, n. 3, p. 355, 1994.

ARAUJO, V. E. M.; MOREIRA, E. C.; NAVEDA, L. A. B.; SILVA, J. A.; CONTRERAS, R. L. Frequency of Anti-Leptospira Interrogans Agglutinins in Bovine Serum Samples in Minas Gerais, Brazil, 1980 to 2002. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 430–435, 2005.

BACKHANS, A.; JACOBSON, M.; HANSSON, I.; LEBBAD, M.; LAMBERTZ, S. T.; GAMMELGÅRD, E.; SAAGER, M.; AKANDE, O.; FELLSTRÖM, C. Occurrence of pathogens in wild rodents caught on Swedish pig and chicken farms. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 9, p. 1885–1891, 2013.

BAL, A. E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; MEZA-BREWSTER, J. DE; KORVER, H.; TERPSTRA, W. J. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1894–1898, 1994.

BAROCCHI, M. A.; KO, A. I.; RAMOS FERRER, S.; TUCUNDUVA FARIA, M.; GALVÃO REIS, M.; RILEY, L. W. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni* and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 191–195, 2001.

BENDER, D. J.; CONTRERAS, T. A.; FAHRIG, L. Habitat loss and population decline:

A meta-analysis of the patch size effect. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 517–533, 1998.

BENNETT, A. F. Habitat corridors and the conservation of small mammals in a fragmented forest environment. **Landscape Ecology**, v. 4, n. 2–3, p. 109–122, 1990.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. **Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance** *Lancet Infectious Diseases*, 2003.

BROOKS, T. M.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. DA; RYLANDS, A. B.; KONSTANT, W. R.; FLICK, P.; PILGRIM, J.; OLDFIELD, S.; MAGIN, G.; HILTON-TAYLOR, C. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. **Conservation Biology**, v. 16, n. 4, p. 909–923, 2002.

BROWN, P. D.; GRAVEKAMP, C.; CARRINGTON, D. G.; KEMP, H. VAN DE; HARTSKEERL, R. A.; EDWARDS, C. N.; EVERARD, C. O. R.; TERPSTRA, W. J.; LEVETT, P. N. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 110–114, 1995.

BROWNSTEIN, J. S.; HOLFORD, T. R.; FISH, D. **A climate-based model predicts the spatial distribution of the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in the United States** *Environmental Health Perspectives*, 2003.

BUCHMANN, C. M.; SCHURR, F. M.; NATHAN, R.; JELTSCH, F. Habitat loss and fragmentation affecting mammal and bird communities-The role of interspecific competition and individual space use. **Ecological Informatics**, v. 14, p. 90–98, 2013.

CALDAS, E. M. As leptospiroses no Brasil. **Revista da Fundação SESP**, v. 2, n. 31, p. 239–245, 1992.

CASTRO, V.; AZEVEDO, S. S. DE; GOTTI, T. B.; BATISTA, C. S. A.; GENTILI, J.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; GENOVEZ, M. É. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 1, p. 3–11, 2008.

CINCOTTA, R. P.; WISNEWSKI, J.; ENGELMAN, R. Human population in the biodiversity hotspots. **Nature**, v. 404, n. 6781, p. 990–992, 2000.

CLEAVELAND, S.; LAURENSEN, M. K.; TAYLOR, L. H. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 356, n. 1411, p. 991–999, 2001.

CORDEIRO, F.; SULZER, C. R.; RAMOS, A. D. A.; ALMEIDA, R. A. DE. *Leptospira interrogans* in several wildlife species in southeast Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 19–29; 28 ref, 1981.

CORRÊA, S. H. R. Leptospirose. In: ROCA (Ed.). **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: [s.n.]. p. 736–741; 2007.



CORREIA, L.; LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Effects of rainfall on incidental and host-maintained leptospiral infections in cattle in a tropical region. **Veterinary Journal**, v. 220, p. 63–64, 2017.

CRODA, J.; RAMOS, J. G. R.; MATSUNAGA, J.; QUEIROZ, A.; HOMMA, A.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospira immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1528–1534, 2007.

ELLIS, W. A. Animal Leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 99–137, 2015.

EMBRAPA. Panorama do Leite. **Intelactus**, v. 7, n. 75, p. 14, 2015.

EMMONS, L.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals: a field guide**. [s.l: s.n.].

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Clinical laboratory diagnosis of leptospirosis**. [s.l: s.n.].

FARIA, M. T. DE; CALDERWOOD, M. S.; ATHANAZIO, D. A.; MCBRIDE, A. J. A.; HARTSKEERL, R. A.; PEREIRA, M. M.; KO, A. I.; REIS, M. G. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 108, n. 1, p. 1–5, 2008.

FARIÑA, F.; SCIALFA, E.; BOLPE, J.; PASQUALETTI, M.; ROSA, A.; RIBICICH, M. Study of *Trichinella* spp. in rodents that live near pig farms in an endemic region of the Province of Buenos Aires, Argentina. **J Bacteriol Parasitol**, v. 3, n. 140, p. 2, 2012.

FIGUEIREDO, A. DE O.; PELLEGRIN, A. O.; GONÇALVES, V. S. P.; FREITAS, E. B.; MONTEIRO, L. A. R. C.; OLIVEIRA, J. M. DE; OSÓRIO, A. L. A. R. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 375–381, 2009.

FONSECA, G. A. B.; HERRMANN, G.; LEITE, Y. L. R.; MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; PATTON, J. L. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. **Occasional Papers in Conservation Biology**, v. 4, n. 4, p. 1–38, 1996.

FORNAZARI, F.; LANGONI, H.; MARSON, P. M.; NÓBREGA, D. B.; TEIXEIRA, C. R. *Leptospira* reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents. **Acta Tropica**, v. 178, p. 205–212, 2018.

GALVÃO, M. A. M.; SILVA, L. J. DA; NASCIMENTO, E. M. M.; CALIC, S. B.; SOUSA, R. DE; BACELLAR, F. Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurrence, distribution and diagnosis. **Revista de saude publica**, v. 39, n. 5, p. 850–856, 2005.

GOUVEIA, E. L.; METCALFE, J.; CARVALHO, A. L. F. DE; AIRES, T. S. F.; VILLASBOAS-BISNETO, J. C.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; SALGADO, K.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 505–508,

2008.

GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Rodents of the subfamily Sigmodontinae (Myomorpha: Cricetidae) as hosts for South American hard ticks (Acari: Ixodidae) with hypotheses on life history. **Zootaxa**, n. 2904, p. 45–65, 2011.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTISTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Plêiade, 2001.

HASHIMOTO, V. Y.; DIAS, J. A.; SPOHR, K. A. H.; SILVA, M. C. P.; ANDRADE, M. G. B.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. Prevalência e fatores de risco associados á *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 99–105, 2012.

JOHNSTONE, C. P.; LILL, A.; REINA, R. D. Habitat loss, fragmentation and degradation effects on small mammals: Analysis with conditional inference tree statistical modelling. **Biological Conservation**, v. 176, p. 80–98, 2014.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 3–14, 2004.

JORGE, S.; HARTLEBEN, C. P.; SEIXAS, F. K.; COIMBRA, M. A. A.; STARK, C. B.; LARRONDO, A. G.; AMARAL, M. G.; ALBANO, A. P. N.; MINELLO, L. F.; DELLAGOSTIN, O. A.; BROD, C. S. *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum (*Didelphis albiventris*): First isolation in Brazil. **Acta Tropica**, v. 124, n. 2, p. 147–151, 2012.

KIJLSTRA, A.; MEERBURG, B.; CORNELISSEN, J.; CRAEYE, S. DE; VEREIJKEN, P.; JONGERT, E. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 156, n. 3–4, p. 183–190, 2008.

KLINK, C. A.; KLINK, C. A.; MACHADO, R. B.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147–155, 2005.

KO, A. I.; GALVÃO REIS, M.; RIBEIRO DOURADO, C. M.; JOHNSON, W. D.; RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820–825, 1999.

KROVER, H.; KOLK, A. H. J.; VINGERHOED, J.; LEEUWEN, J. VAN; TERPSTRA, W. J.; VAN, L. J. Classification of serovars of the icterohaemorrhagiae serogroup by monoclonal antibodies. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 44, n. 1, p. 15–18; 9 ref, 1988.

LANGONI, H.; SOUZA, L. C. DE; SILVA, A. V. DA; CUNHA, E. L. P.; SILVA, R. C. DA. Aspectos epidemiológicos nas leptospiroses: Pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp, isolamento e pesquisa biomolecular em bovinos, roedores e trabalhadores de propriedades rurais do Município de Botucatu, SP, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 3, p. 190–199, 2008.

LEUNG, L. K. P.; CLARK, N. M. Bait avoidance and habitat use by the roof rat, *Rattus*

rattus, in a piggery. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 55, n. 2, p. 77–84, 2005.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 296–326, 2014.

LEVETT, P. N.; FONSECA, K.; TSANG, R. S.; KADKHODA, K.; SERHIR, B.; RADONS, S. M.; MORSHED, M. Canadian Public Health Laboratory Network laboratory guidelines for the use of serological tests (excluding point-of-care tests) for the diagnosis of syphilis in Canada. **The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale**, v. 26 Suppl A, p. 6A–12A, 2015.

LLANES, A.; RESTREPO, C. M.; RAJEEV, S. Whole genome sequencing allows better understanding of the evolutionary history of leptospira interrogans serovar hardjo. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, 2016.

LOGIUDICE, K.; OSTFELD, R. S.; SCHMIDT, K. A.; KEESING, F. The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 2, p. 567–71, 2003.

LOUREIRO, A. P.; HAMOND, C.; PINTO, P.; BREMONT, S.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. Molecular analysis of leptospires from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic cattle in Rio de Janeiro - Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura. **Research in Veterinary Science**, v. 105, p. 249–253, 2016.

LUCCHESI, L.; BENKIRANE, A.; HAKIMI, I.; IDRISSE, A. EL. Seroprevalence study of the main causes of abortion in dairy cattle in Morocco. **Veterinaria italiana**, v. 52, n. 1, p. 13–9, 2016.

MAGAJEVSKI, F. S.; SILVA GIRIO, R. J.; MATHIAS, L. A.; MYASHIRO, S.; GENOVEZ, M. É.; SCARCELLI, E. P. Detection of Leptospira spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to Leptospira interrogans serovar Hardjo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 43–47, 2005.

MARQUES, A. E.; ROCHA, W. V.; BRITO, W. M. E. D. DE; FIORAVANTI, M. C. S.; PARREIRA, I. M.; JAYME, V. DE S. Prevalence of anti-Leptospira spp. antibodies and epidemiological aspects of the infection in cattle of Goiás/Brazil. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 607–617, 2010.

MATTHIAS, M. A.; RICARDI, J. N.; CESPEDES, M.; DIAZ, M. M.; GALLOWAY, R. L.; SAITO, M.; STEIGERWALT, A. G.; PATRA, K. P.; ORE, C. V.; GOTUZZO, E.; GILMAN, R. H.; LEVETT, P. N.; VINETZ, J. M. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique Leptospira associated with a Rattus species reservoir in the Peruvian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, 2008.

MCBRIDE, A. J. A.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 376–386, 2005.

MERIEN, F.; PORTNOI, D.; BOURHY, P.; CHARAVAY, F.; BERLIOZ-ARTHAUD,

A.; BARANTON, G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, n. 1, p. 139–147, 2005.

MIRAGLIA, F.; MORAIS, Z.M.; CORTEZ, A.; MELVILLE, P. A.; MARVULLO, M. F.V.; RICHTZENHAIN, L.J.; VISINTIN, F.A.; VASCONCELLOS, S. A. Comparison of four antibiotics for inactivating leptospires in bull semen diluted in egg yolk extender and experimentally inoculated with *leptospira santarosai* serovar guaricura. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.34, p.147-151, 2003.

MITTERMEIER, R. A.; MYERS, N.; MITTERMEIER, C. G.; ROBLES, G. **Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. [s.l.] CEMEX, SA, Agrupación Sierra Madre, SC, 1999.

MOREIRA, R. Q.; CABRAL, D. D.; LIMA, A. M. C.; OLIVEIRA, P. R. Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Leptospira interrogans* em duas propriedades de vacas leiteiras com relatos de prejuízos reprodutivos no município de Goiandira, Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 396–401, 2010.

OLIVER, J. H. Biology and Systematics of Ticks (Acari: Ixodida). **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 397–430, 1989.

OSTFELD, R. S.; KEESING, F. **Biodiversity and disease risk: The case of Lyme disease** *Conservation Biology*, 2000.

PAIM, E. R. D. A.; CIUFFA, A. Z.; GOMES, D. O.; REZENDE, L. M.; SILVA, D. M.; PIRES, B. C.; CUCCATO, L. P.; REIS, T. F. M. DOS; LIMA, A. M. C. Leptospirosis in dairy cattle in Ipameri, state of Goiás, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 1937–1946, 2016.

PALANIAPPAN, R. U. M.; CHANG, Y. F.; CHANG, C. F.; PAN, M. J.; YANG, C. W.; HARPENDING, P.; MCDONOUGH, S. P.; DUBOVI, E.; DIVERS, T.; QU, J.; ROE, B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, n. 2, p. 111–117, 2005.

PEZZELLA, M.; LILLINI, E.; STURCHIO, E.; IERARDI, L. A.; GRASSI, M.; TRADITI, F.; CRISTALDI, M. Leptospirosis survey in wild rodents living in urban areas of Rome. **Annali di Igiene**, v. 16, n. 6, p. 721–726, 2004.

PICARDEAU, M. **Diagnosis and epidemiology of leptospirosis** *Medecine et Maladies Infectieuses*, 2013.

PICARDEAU, M.; BRENOT, A.; GIRONS, I. SAINT. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* *flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 189–199, 2001.

PINHEIRO, A. L. B. C.; BULOS, L. H. S.; ONOFRE, T. S.; PAULA GABARDO, M. DE; CARVALHO, O. V. DE; FAUSTO, M. C.; GUEDES, R. M. C.; ALMEIDA, M. R. DE; SILVA, A. Verification of natural infection of peridomestic rodents by PCV2 on

commercial swine farms. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 764–768, 2013.

PRUSINSKI, M. A.; CHEN, H.; DROBNACK, J. M.; KOGUT, S. J.; MEANS, R. G.; HOWARD, J. J.; OLIVER, J.; LUKACIK, G.; BACKENSON, P. B.; WHITE, D. J. Habitat Structure Associated with *Borrelia burgdorferi* Prevalence in Small Mammals in New York State. **Environmental Entomology**, v. 35, n. 2, p. 308–319, 2006.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, n. 3, p. 223–230, 1997.

ROMERO, E. C.; YASUDA, P. H. Molecular characterization of *Leptospira* sp. strains isolated from human subjects in Sao Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 373–378, 2006.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265–270, 2005.

SCHLINKERT, H.; LUDWIG, M.; BATÁRY, P.; HOLZSCHUH, A.; KOVÁCS-HOSTYÁNSZKI, A.; TSCHARNTKE, T.; FISCHER, C. Forest specialist and generalist small mammals in forest edges and hedges. **Wildlife Biology**, v. 22, n. 3, p. 86–94, 2016.

SEGURA, E. R. GANOZA, C. A.; CAMPOS, K.; RICALDI, J. N.; TORRES, S.; SILVA, H.; CÉSPEDES, M. J.; MATTHIAS, M. A.; SWANCUTT, M. A.; LÓPEZ LIÑÁN, R.; GOTUZZO, E.; GUERRA, H.; GILMAN, R. H.; VINETZ, J. M. Clinical Spectrum of Pulmonary Involvement in Leptospirosis in a Region of Endemicity, with Quantification of Leptospiral Burden. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 3, p. 343–351, 2005.

SILVA, F. J.; CONCEIÇÃO, W. L. F.; FAGLIARI, J. J.; GIRIO, R. J. S.; DIAS, R. A.; BORBA, M. R.; MATHIAS, L. A. Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 303–312, 2012.

SMITH, C. R.; KETTERER, P. J.; MCGOWAN, M. R.; CORNEY, B. G. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle. **Australian veterinary journal**, v. 71, n. 9, p. 290–294, 1994.

SMYTHE, L.; ADLER, B.; HARTSKEERL, R. A.; GALLOWAY, R. L.; TURENNE, C. Y.; LEVETT, P. N. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART 5, p. 1859–1862, 2013.

SOUZA, M. A. DE; CASTRO, J. R. DE; MOREIRA, R. Q.; BOMBONATO, N. G.; SOARES, P. M.; CORREIA LIMA, A. M. Anti-*Leptospira* spp. Antibodies in Several Animal Species on the Same Farm. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 1, p. 202–207, 2016.

STODDARD, R. A.; GEE, J. E.; WILKINS, P. P.; MCCAUSTLAND, K.; HOFFMASTER, A. R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan

polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 3, p. 247–255, 2009.

SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, 2013.

THAIPADUNPANIT, J.; CHIERAKUL, W.; WUTHIEKANUN, V.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; AMORNCHAI, P.; BOONSLIP, S.; SMYTHE, L. D.; LIMPAIBOON, R.; HOFFMASTER, A. R.; DAY, N. P. J.; PEACOCK, S. J. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: A case-control study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

THORNER, A. R.; WALKER, D. H.; PETRI, JR., W. A. Rocky Mountain Spotted Fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 1353–1359, 1998.

TIMM, R. M.; MARSH, R. E.; CORRIGAN, R. M.; HOLSCHER, K. Controlling rats and mice in swine facilities. **Extension bulletin E-Cooperative Extension Service, Michigan State University (USA)**, 1987.

TOPAZIO, J.; TONIN, A. A.; MACHADO, G.; NOLL, J. C.; RIBEIRO, A.; MOURA, A. B.; CARMO, G. M.; GROSSKOPF, H. M.; MARTINS, J. L.; BADKE, M. R.; STEFANI, L. M.; LOPES, L. S.; DA SILVA, A. S. Antibodies to *Leptospira interrogans* in goats and risk factors of the disease in Santa Catarina (West side), Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 99, p. 53–57, 2015.

TUBIANA, S.; MIKULSKI, M.; BECAM, J.; LACASSIN, F.; LEF??VRE, P.; GOURINAT, A. C.; GOARANT, C.; D'ORTENZIO, E. Risk Factors and Predictors of Severe Leptospirosis in New Caledonia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, 2013.

VIEIRA, A. S.; PINTO, P. S.; LILENBAUM, W. A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. **Tropical Animal Health and Production**, p. 1–10, 2017.

VINETZ, J. M.; GLASS, G. E.; FLEXNER, C. E.; MUELLER, P.; KASLOW, D. C. Sporadic Urban Leptospirosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 125, n. 10, p. 794–798, 1996.

WIMBERLY, M. C.; YABSLEY, M. J.; BAER, A. D.; DUGAN, V. G.; DAVIDSON, W. R. Spatial heterogeneity of climate and land-cover constraints on distributions of tick-borne pathogens. **Global Ecology and Biogeography**, v. 17, n. 2, p. 189–202, 2008.

## **CAPÍTULO 2**

**Marsupiais e roedores portadores renais de leptospiros patogênicos no vale do rio  
Paranaíba, Brasil.**

# **Marsupiais e roedores portadores renais de leptospiros patogênicas no vale do rio Paranaíba, Brasil.**

## **Resumo**

A bacia do rio Paranaíba está predominantemente inserida no bioma Cerrado, entretanto se caracteriza como região de ecótono, devido a ocorrência também de manchas características de Mata Atlântica. Pequenos mamíferos não voadores são animais que podem responder à fragmentação da vegetação natural, de modo diverso a outros grupos, com aumento de riqueza e abundância de espécies. Informações sobre a importância de pequenos mamíferos não voadores na cadeia epidemiológica da leptospirose ainda são escassas. O presente estudo descreve as diferentes espécies de pequenos mamíferos não voadores no vale do rio Paranaíba e identificação de marsupiais e roedores como portadores renais de leptospiros patogênicas. Foram capturados 72 pequenos mamíferos não voadores, de duas espécies de marsupiais ( $n = 39$ ) e oito espécies de roedores ( $n = 33$ ). Dentre os marsupiais, 14 (32,56%) foram positivos à PCR, e 10 espécimes de roedores (34,48%) foram diagnosticados como portadores renais pela mesma técnica. Apenas um espécime de *Gracilinanus agilis*, foi reagente ao MAT (técnica da aglutinação microscópica) para o sorovar Australis em um título de 100. Pequenos mamíferos não voadores são importantes reservatórios, cumprindo um papel de veiculadores de leptospiros patogênicas no vale do rio Paranaíba, principalmente aquelas espécies capazes de promover uma interface entre os diferentes ambientes estudados (*Calomys* sp., *Nectomys squamipes*), e que apresentaram uma alta frequência de portadores renais (*Gracilinanus agilis*). É o primeiro relato de identificação, via PCR, de *Gracilinanus agilis*, *Calomys* sp., *Hylaeamys megacephalus* e *Oecomys bicolor* como portadores renais e veiculadores de leptospiros patogênicas.

**Palavras-chave:** *Gracilinanus agilis*. Reservatório. Ecótono. Mata Atlântica. Cerrado.

## **1. Introdução**

A leptospirose é uma doença cosmopolita, que ocorre com maior frequência em regiões quentes e úmidas, onde favorece a sobrevivência da bactéria no ambiente. É transmitida entre mamíferos tanto por contato direto entre animais infectados, quanto pela



exposição a água, solo e alimentos contaminados com a urina de animais portadores renais. No Brasil, o endemismo dessa doença favorece a exposição da população humana a ambientes contaminados e animais infectados, tanto selvagens quanto sinantrópicos e domésticos, representando uma ameaça persistente a saúde pública (de Souza et al., 2016; Faine et al., 1999).

O bioma Cerrado é o segundo maior do Brasil, cobrindo originalmente cerca de 2 milhões de km<sup>2</sup>, o que corresponde a 23% do território do país (Ratter et al., 1997). Mais da metade de sua área original tornou-se pastagens e culturas anuais nos últimos 35 anos, restando apenas 20% de sua área original (Brooks et al., 2002). Isso chama a atenção para um contato cada vez mais íntimo entre os animais de produção, roedores sinantrópicos, humanos, e as espécies de pequenos mamíferos não voadores selvagens. Assim, o fluxo de *Leptospira* spp. no ambiente rural pode ser veiculado pelos pequenos mamíferos não voadores selvagens, como também pelos roedores sinantrópicos, animais de produção e de trabalho, aumentando o risco ocupacional da leptospirose para humanos (Akande, 2011; Backhans et al., 2013; Miller et al., 2013; Silva, 2014).

A bacia do rio Paranaíba está predominantemente inserida no bioma Cerrado, entretanto se caracteriza por uma região de ecótono, devido a ocorrência também de manchas características de Mata Atlântica. Em função de atividades antrópicas nesta região, como a bovinocultura, em apenas 21,8% de sua área total ainda resta vegetação nativa (Agência Nacional de Águas, 2013). Nesse sentido, tal região é uma área sujeita a forte e constante perda de hábitat, com alterações que podem afetar todas as relações entre flora, fauna e microbiota associada. Assim, avaliar e acompanhar as interações entre hospedeiros, agentes infecciosos e ambiente nessa área, torna-se de grande valor regional, devido as peculiaridades de espécies e da cobertura vegetal encontrada, e também global,

quando consideramos o conceito de saúde única, na compreensão da dinâmica dessas relações.

Pequenos mamíferos não voadores são animais que podem responder à fragmentação de modo diverso a outros grupos, com aumento de riqueza e abundância de espécies (Pardini, 2004), e a proliferação destas espécies selvagens oportunistas e generalistas, por sua vez favorecem a proliferação e dispersão de patógenos no ambiente (Daszak et al., 2004; Primack e Rodrigues, 2001). Roedores são os principais reservatórios de leptospiros nos meios urbano, rural e selvagens. Os marsupiais dividem seu ambiente de vida com os roedores, desta forma são continuamente desafiados, e se infectam por contato indireto com este ambiente contaminado. Sendo assim, se tornam importantes na epidemiologia da leptospirose (Fornazari et al., 2018).

O risco da infecção por leptospiros depende da ecologia das espécies de hospedeiros, como a área de vida, comportamento de forrageamento e contato com outras espécies (Fornazari et al., 2018). Algumas doenças mantidas por pequenos mamíferos não voadores parecem estar associadas, em algum nível, a alterações no equilíbrio natural entre hospedeiros e patógenos. Nesse sentido, estudos ecológicos com pequenos mamíferos não voadores são relevantes para a compreensão mais aprofundada das consequências de alterações ambientais (LoGiudice et al., 2003; Ostfeld e Keesing, 2000) e elaboração de ações mitigadoras dos problemas resultantes dessas alterações (Brownstein et al., 2003; Fish, 1995; Prusinski et al., 2006).

Informações sobre a importância pequenos mamíferos não voadores na cadeia epidemiológica da leptospirose ainda são escassas, e até então não se identificou seu verdadeiro papel na manutenção e circulação de leptospiros no ambiente. A PCR, apesar de ser considerada uma técnica adequada para identificação de reservatórios, e indicada para o diagnóstico de portadores renais, até agora foi pouco usada em estudos

epidemiológicos na América Latina (Faria et al., 2008; Vieira et al., 2017). Por isso, objetivou-se identificar quais as espécies mais frequentes de pequenos mamíferos não voadores de ocorrência no vale do Rio Paranaíba, e investigar a circulação de leptospiros patogênicas nessas espécies.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Área de estudo**

O estudo foi conduzido em três áreas ao longo do vale do rio Paranaíba (Figura 1). A primeira área de coleta localiza-se no município de Ipiacu, estado de Minas Gerais, classificado como região do Baixo Paranaíba (18,7770833S; 49,8978889W); a segunda área situa-se no município de Goiandira, Goiás, a representar o Médio Paranaíba (18,1630556S; 48,1354722W); e a terceira área situa-se no município de Guimarães, Minas Gerais, no Alto Paranaíba (18,8101944S; 46,6755278W).

Não foi atribuído grau diferente de degradação a essas três áreas, uma vez que todas se encontram altamente impactadas por agropecuária. Entretanto, há uma clara distinção entre elas, principalmente quanto à matriz e a complexidade representada pelas áreas de mata. A matriz da área do Baixo Paranaíba (Figura 2A) é composta principalmente de cana, com pequenas e isoladas manchas de vegetação nativa, remanescentes florestais degradados de Cerrado. A matriz do Médio Paranaíba (Figura 2B) é caracterizada pela presença de pastagens com muitos fragmentos de matas nativas (formações florestais de Cerrado e de Mata Atlântica) sobre solos rochosos e pouco profundos. E na matriz do Alto Paranaíba (Figura 2C) identificou-se maior parte da área utilizada para agricultura (cará, soja, milho e eucalipto), mas com faixas de mata (formações florestais de Cerrado e de Mata Atlântica) conectadas entre si e margeando corpos d'água.

## 2.2. Ambientes de captura de pequenos mamíferos

As capturas de pequenos mamíferos não voadores foram conduzidas, em cada área, em quatro ambientes distintos:

1. Ambiente antrópico: Considerou-se ambiente antrópico os locais próximos a habitações humanas, paióis, casas de máquinas, galpões de armazenamento de insumos.

2. Mata estacional decidual e semidecidual: Considerou-se como mata estacional decidual e semidecidual as formações compostas por estrato arbóreo que durante a estação seca perde toda ou parte das folhas, segundo a classificação de Oliveira-Filho e Ratter (2002).

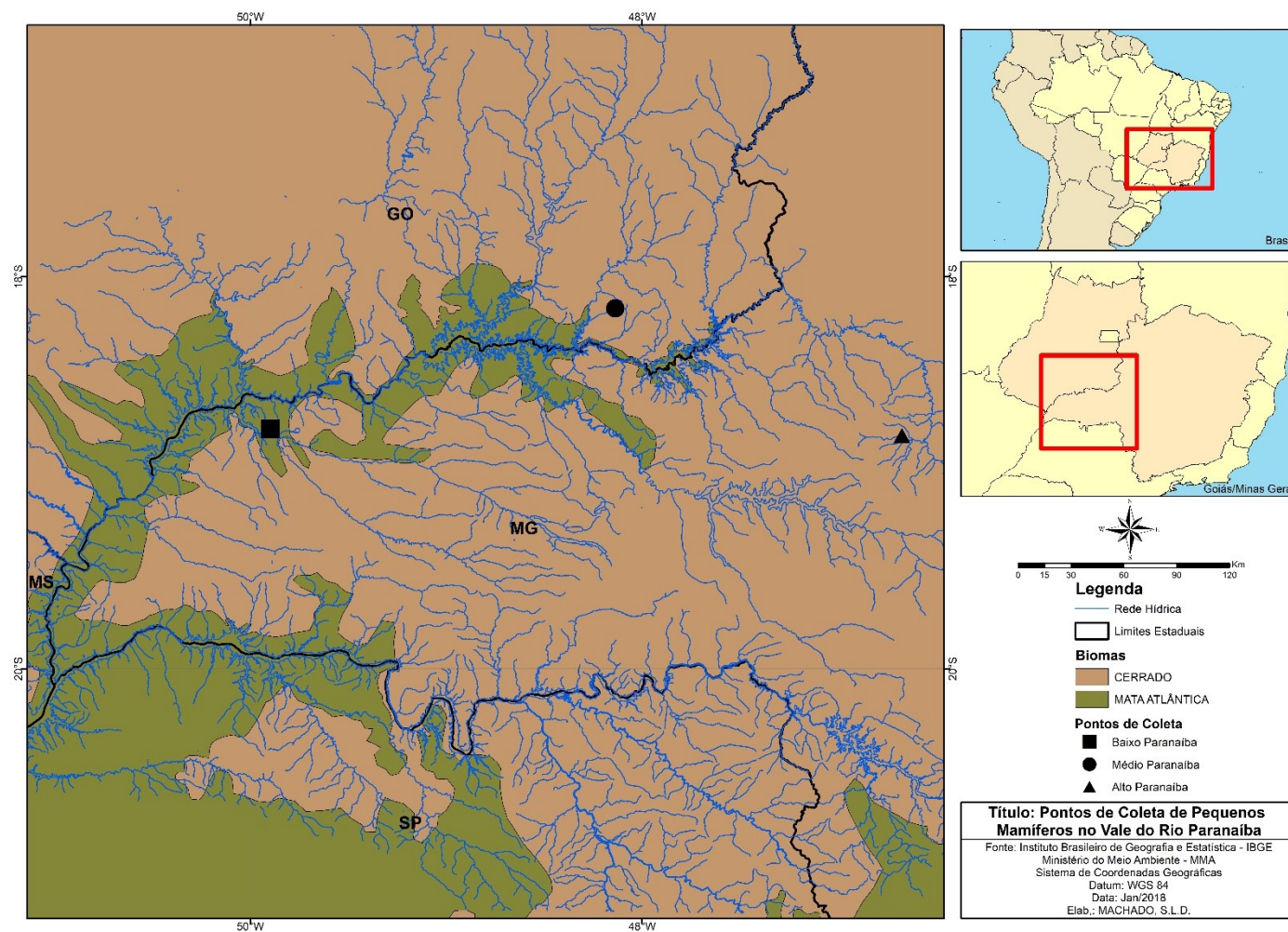
3. Matas ribeirinhas: Considerou-se como matas ribeirinhas, seguindo a caracterização de Oliveira-Filho e Ratter (2002), aquelas matas estacionais semidecíduais ou decíduais que acompanham a margem de cursos d'água.

4. Pasto sujo: Considerou-se pasto sujo a área utilizada para pastoreio do gado, com predomínio do capim *Brachiaria decumbens* em sua altura máxima de crescimento. O pasto amostrado é margeado por alguma das matas já descritas e utilizadas para coleta de pequenos mamíferos não voadores.

O clima da região é do tipo Aw de Köppen (Köppen, 1948), caracterizado por uma estação seca de abril a setembro e uma estação úmida de outubro a março, podendo haver variações quanto ao início e término de cada estação climática. Os mapas com a caracterização das áreas de coleta foram elaborados a partir de bancos de dados públicos disponibilizados pelo Google Earth®, e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Utilizou-se as ferramentas dos programas Google Earth® e ArcGis® para a confecção destes mapas.

## 2.3. Questões éticas

132 Os procedimentos realizados em animais neste estudo foram autorizados pela  
133 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia  
134 sob número de protocolo 151/16. Os procedimentos realizados com pequenos mamíferos  
135 não voadores foram também autorizados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente  
136 (IBAMA), por meio do Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade  
137 (ICMBio), sob número de protocolo no Sistema de Autorização e Informação em  
138 Biodiversidade (SISBIO) 52983/1.



139

140 Figura 1. Distribuição espacial dos biomas Mata Atlântica e Cerrado, e localização dos pontos de coletas de pequenos mamíferos não voadores no  
 141 vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.



Figura 2. Matriz de cobertura vegetal dos pontos de coletas na região do vale do rio Paranaíba, municípios de Ipiacu-MG (Baixo Paranaíba), Goiandira-GO (Médio Paranaíba) e Guimarães-MG (Alto Paranaíba), 2016. Fonte: Google Earth.



## 2.4. Captura de pequenos mamíferos

Em cada um dos três sítios de estudo, duas campanhas foram conduzidas para captura de pequenos mamíferos não voadores, uma ao final da estação chuvosa (precipitação acumulada de outubro de 2015 a março de 2016: 1260 mm) e outra no final da seca (precipitação acumulada de abril a setembro de 2016: 195 mm) (INPE, 2016).

Foram utilizadas armadilhas dos tipos *Sherman* e *Tomahawk*, iscadas com rodelas de banana cobertas por farelo de paçoca (Ramos, 2013; Limongi et al., 2016; Ramirez, 2017). Nos ambientes antrópicos, foram utilizadas, em média, oito armadilhas tipo *Sherman* colocadas em variados pontos considerados propícios. Para os ambientes de mata decidual e semidecidual, assim como matas ribeirinhas, 50 armadilhas tipo *Sherman* foram montadas em cada uma das duas fisionomias, dispostas em linhas com estações de captura a cada dez metros, em que uma armadilha era instalada sobre o solo e outra sobre uma árvore em cada estação. No ambiente de pasto sujo, oito armadilhas tipo *Tomahawk*, e oito tipos *Sherman* foram colocadas linearmente sobre o solo a cada dez metros. Todas as armadilhas foram inspecionadas diariamente pela manhã, tendo a isca trocada a cada 48 horas ou repostas quando necessário.

Os animais capturados foram anestesiados por uma associação de cloridrato de tiletamina 250mg com cloridrato de zolazepam 250mg na dose de 0,1mL/Kg pela via intramuscular (Silva, 2014) para biometria e sexagem. As fêmeas prenhes e em amamentação foram acondicionadas em sacos de algodão até o retorno completo da anestesia, e posteriormente soltas nos seus respectivos locais de captura. Os demais espécimes foram eutanasiados por exsanguinação intracardíaca (CFMV, 2013; CONCEA, 2013).



## 2.5. Coleta de Material Biológico

Os animais não eutanasiados foram submetidos apenas à punção sanguínea pela veia lateral da cauda (Lee e Goosens, 2015). Nos animais eutanasiados, a coleta de sangue foi feita pelo método da exsanguinação intracardiaca (CFMV, 2013; CONCEA, 2013; Silva, 2014). As amostras de sangue foram armazenadas em microtubos até a retração do coágulo, e posteriormente fez-se a separação do soro sanguíneo. As amostras de soro foram devidamente identificadas e armazenadas a -20 °C.

Também nos espécimes eutanasiados, fez-se uma incisão abdominal para retirada dos rins. Em seguida, tão logo retirou-se o órgão, próximo a um bico de Bunsen com chama azul, por meio de bisturi esterilizado, um rim de cada espécime foi recortado e adicionado em um tubo esterilizado contendo meio de cultura líquido Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris – DifcoR (EMJH), enriquecido em 15% com soro sanguíneo de coelho (inativado a 60 °C por 30 minutos), e adicionado de 5-fluorouracil a 300mg/L, e ácido nalidixico na concentração de 20mg/L. Posteriormente cada amostra foi identificada e incubada à temperatura de 28°C por 48 horas, e posteriormente, uma alíquota foi repicada em meio EMJH com 15% de enriquecimento com soro sanguíneo de coelho para tentativa de isolamento de *Leptospira*, o restante da amostra com o tecido renal foi congelada a -80°C para aplicação do diagnóstico pela PCR (Ellis et al., 1982; Magajevski et al., 2005; Thiermann, 1980).

## 2.6. Sorologia

As amostras de soro sanguíneo de pequenos mamíferos não voadores foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, para a detecção de anticorpos contra 25 sorovares de *Leptospira* spp, com 21 sorovares de cepas padrão (Australis,

Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Castelonis, Copenhageni, Cynopteri, Djasiman, Guaricura, Grippytyphosa, Hardjobovis, Hardjoprajitno, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Sejroe, Shermani, Tarassovi e Wolffi), e quatro sorovares de estirpes de isolados de pequenos mamíferos não voadores sinantrópicos e selvagens no Brasil (Brasiliensis, Pomona e 2 diferentes estirpes de Copenhageni) (Quadro 1). Tais coleções de cepas padrão e de estirpes de isolados brasileiros foram gentilmente doadas pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal Fluminense.

O diagnóstico sorológico foi feito pela técnica da aglutinação microscópica (MAT), padronizando-se reação maior ou igual a 50% de aglutinação de antígenos por campo a uma diluição final de 1:100 do soro sanguíneo (Desvars et al., 2013; Dos Santos Paixão et al., 2014; Faine et al., 1999; Faria et al., 2008; Vieira et al., 2016).

## 2.7. PCR

Os fragmentos renais foram enviados ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense para realização de extração de DNA e ensaio da PCR para detecção do gene *lipL32*, comum a estirpes patogênicas de *Leptospiras*. A extração de DNA de tecido foi realizada com Kit DNeasy® blood & Tissue Kit (Qiagen) conforme instruções do fabricante. Uma etapa prévia de lavagem e digestão do tecido foi realizada: duas lavagens com 2 ml de tampão PBS 1X por duas horas cada e com 20µl de Proteinase K 20 mg/ml (Invitrogen®) á 56°C até completa digestão.

No ensaio da PCR para a detecção do gene *lipL32* foram empregados os *primers* *lipL32*-45F (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') e *lipL32*-286R (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3'), projetados por Stoddard et al. (2009), na qual amplifica um fragmento de 243pb. A reação foi realizada com volume final de 25µl contendo: 3,5

mM de  $MgCl_2$ ; 7,5 pmol de cada *primer*; 1X GoTaqReaction Buffer; 250 $\mu$ M de cada desoxinucleotideo trifosfatado (dNTP), 0,5 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 6  $\mu$ l de DNA. Seguindo o programa de temperaturas: desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por um minuto; e extensão final de 72°C por 5 minutos. Foi utilizado a estirpe padrão *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe FIOCRUZ L1-130 como controle positivo para as reações de PCR.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 2% com tampão 0,5 X TBE (Tris – ácido bórico – EDTA) e o DNA presente nos produtos de PCR foi corado com uma solução 20X Gel Red® (Biotium) e visualizados sob luz ultravioleta.

## **2.8. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada por meio do teste de associação não-paramétrico de qui-quadrado, para verificar a significância da associação dos fatores estudados. O software estatístico R Core Team (2016) foi utilizado para realização dos testes.

239 Quadro 1. Antígenos empregados na técnica de soroaglutinação microscópica (MAT), segundo a cepa, espécie, sorogrupo, sorovar, hospedeiro, instituição de  
 240 origem e ano do isolamento.

Cepas Padrão						
Cepa	Espécie	Sorogrupo	Sorovar	Hospedeiro	Instituição de Origem	Ano
Sponselee	<i>L. borgpeterseni</i>	Sejroe	Hardjobovis	-	Instituto Pasteur	-
Moskva V	<i>L. kirschneri</i>	Grippytyphosa	Grippytyphosa	-	Instituto Pasteur	-
Hond Utrecht IV	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	-	Instituto Pasteur	-
Ballico	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	-	Instituto Pasteur	-
Akiyami	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	-	Instituto Pasteur	-
Verdun	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	-	Instituto Pasteur	-
M84	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	-	Instituto Pasteur	-
Djasiman	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	-	Instituto Pasteur	-
Van Tienen	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	-	Instituto Pasteur	-
Castellon 3	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	-	Instituto Pasteur	-
CZ 214k	<i>L. noguchi</i>	Panama	Panama	-	Instituto Pasteur	-
Jez Bratislava	<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	-	FIOCRUZ	-
1342K	<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	-	Instituto Pasteur	-
M20	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	-	FIOCRUZ	-
Poi	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	-	Instituto Pasteur	-
Perepelitsin	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	-	Instituto Pasteur	-
3705	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	-	Instituto Pasteur	-
3522C	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	-	Instituto Pasteur	-
BOV G	<i>L. santarosai</i>	Sejroe	Guaricura	-	FIOCRUZ	-
Hardjoprajitno	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjoprajitno	-	OMS	-
Hebdomadis	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	-	Instituto Pasteur	-
Estirpes de Isolados no Brasil (pequenos mamíferos não voadores)						
AN776	<i>L. sanarosai</i>	Bataviae	Brasiliensis	Gambá	Instituto Biológico de São Paulo	1961
M10/99	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	<i>Rattus norvegicus</i>	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	1999
Rato	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	<i>Rattus norvegicus</i>	Instituto Biológico de São Paulo	1999
M36/05	<i>L. kirschneri</i>	Pomona	Não caracterizado	<i>Rattus</i> sp	VPS/FMVZ/USP	2005

### 3. Resultados

Foram capturados 72 pequenos mamíferos não voadores, sendo 39 pertencentes a ordem Marsupialia (54,17%) das espécies *Gracilinanus agilis* (n=34/87,2%), *Micoureus paraguayanus* (n=4/10,3%) e *Didelphis albiventris* (n=1/2,5%), e 33 roedores (45,83%) das espécies *Akodon* sp. (n=3/9,1%), *Calomys* sp. (n=4/12,1%), *Cerradomys subflavus* (n=4/12,1%), *Hylaeamys megacephalus* (n=4/12,1%), *Nectomys squamipes* (n=3/9,1%), *Oecomys bicolor* (n=10/30,3%), *Rhipidomys* sp. (n=1/3,1%), *Mus musculus* (n=1/3%) e *Rattus rattus* (n=3/9,1%). Apenas um animal, da espécie *Gracilinanus agilis*, foi sororreagente ao MAT (1,38%), para o sorovar Australis, e este animal também era positivo à PCR.

Dos 72 pequenos mamíferos não voadores capturados nesse estudo, 24 (33,33%) estavam positivos à PCR do gene *lipL32*, próprio de leptospiros patogênicas. Dentre os marsupiais, apenas a espécie *Gracilinanus agilis* (n=4/41,8%) foi positiva à PCR. E entre roedores, 10 espécimes (30,3%) foram diagnosticados como portadores renais, das espécies *Akodon* sp. (n=1/10%), *Calomys* sp. (n=2/20%), *Hylaeamys megacephalus* (n=2/20%); *Nectomys squamipes* (n=3/30%) e *Oecomys bicolor* (n=2/20%). Esses dados estão ilustrados na Tabela 1.

266 Tabela 1. Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR do gene *lipL32*  
 267 de *Leptospiras* patogênicas e reagentes ao MAT em suas respectivas áreas de captura,  
 268 vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.

Área		Capturados	PCR		MAT	
		n	n	%	n	%
Roedores	Alto Paranaíba	10	3	30	0	0
	Médio Paranaíba	14	6	42,86	0	0
	Baixo Paranaíba	9	1	11,11	0	0
	Total Roedores	33	10	30,30	0	0
Marsupiais	Alto Paranaíba	17	3 <sup>b</sup>	17,65 <sup>b</sup>	0	0
	Médio Paranaíba	14	9 <sup>a</sup>	64,29 <sup>a</sup>	0	0
	Baixo Paranaíba	8	2 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>	1	12,5
	Total Marsupiais	39	14	35,89	1	2,56
Pequenos Mamíferos	Total	72	24	33,33	1	1,38

269 \*Letras diferentes entre linhas indicam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ),

270

271 Para todos os parâmetros estudados (área de captura, ambiente de captura, local  
 272 de instalação da armadilha, época do ano, idade, sexo) foram identificadas somente  
 273 diferenças estatísticas significantes para marsupiais infectados entre as áreas de coleta ( $p$   
 274 = 0,0086), em que a frequência de animais portadores renais de *Leptospiras* patogênicas  
 275 na área do Médio Paranaíba (64,29%) foi maior quando comparada à frequência de  
 276 portadores renais das áreas do Alto Paranaíba (17,65%) e Baixo Paranaíba (16,67%)  
 277 (Tabela 1).

Em relação aos ambientes de captura (Tabela 2, Figuras 3, 4 e 5), pôde-se observar que entre os sete animais apanhados no ambiente antrópico nenhum foi positivo a qualquer método de diagnóstico empregado neste estudo (MAT e PCR). Neste ambiente identificou-se as espécies sinantrópicas *Rattus rattus*, *Mus musculus*, e duas espécies selvagens: *Calomys* sp. (um indivíduo capturado no Alto Paranaíba), e *Cerradomys subflavus* (um indivíduo no Baixo Paranaíba).

O ambiente de matas ribeirinhas foi o de maior número de pequenos mamíferos não voadores capturados, 19 roedores (seis positivos à PCR) e 16 marsupiais (três positivos à PCR). Dentre os seis roedores identificados como portadores renais, três eram da espécie *Nectomys squamipes* (dois do Alto Paranaíba, e um no Médio Paranaíba), seguido de dois espécimes de *Oecomys bicolor* (Médio e Baixo Paranaíba), e um *Akodon* sp. capturado em armadilha de solo no Alto Paranaíba. Dentre os marsupiais didelfídeos capturados em matas ribeirinhas, três foram positivos à PCR, dois da região do Alto Paranaíba, e um do Médio Paranaíba, todos da espécie *Gracilinanus agilis*.

O ambiente de matas decíduas e semidecíduas foi o segundo em quantidade de animais capturados (total de 25). Entre os roedores capturaram-se apenas três espécimes, um *Akodon* sp. na região do Alto Paranaíba e negativo à PCR, um *Oecomys bicolor* no Médio Paranaíba, também negativo à PCR, e um *Hylaeamys megacephalus* também no Médio Paranaíba, entretanto positivo à PCR. Foi o ambiente de maior número de marsupiais capturados (22 animais), com um *Micoureus paraguayanus*, positivo à PCR, pertencente ao Alto Paranaíba, e 21 *Gracilinanus agilis* nas áreas de Médio (11 animais capturados, oito positivos a PCR) e Baixo Paranaíba (seis animais capturados, dois positivos à PCR).

301 Tabela 2. Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR do gene *lipL32* de *Leptospiras* patogênicas em suas respectivas áreas e  
 302 ambientes de captura, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.

		Área	Capturados	Ambiente Antrópico		Pasto Sujo		Mata Decidual e Semidecidual		Matas Ribeirinhas	
			n	n	PCR (n/%)	n	PCR (n/%)	n	PCR (n/%)	n	PCR (n/%)
Roedores		Alto Paranaíba	10	2	0	1	0	1	0	6	2 (33,33)
		Médio Paranaíba	14	3	0	3	2 (66,67)	2	1 (50)	6	3 (50)
		Baixo Paranaíba	9	2	0	0	0	0	0	7	1 (14,29)
		Total Roedores	33	7	0	4	2 (50)	3	1 (33,33)	19	6 (31,58)
Marsupiais		Alto Paranaíba	17	0	0	0	0	5	1 (20)	12	2 (16,66)
		Médio Paranaíba	14	0	0	0	0	11	8 (72,72)	3	1 (33,33)
		Baixo Paranaíba	08	0	0	0	0	6	2 (33,33)	1	0
		Total Marsupiais	39	0	0	0	0	22	11 (50)	16	3 (18,75)
Pequenos Mamíferos	Total		72	7	0	4	2 (50)	25	12 (48)	35	9 (25,71)



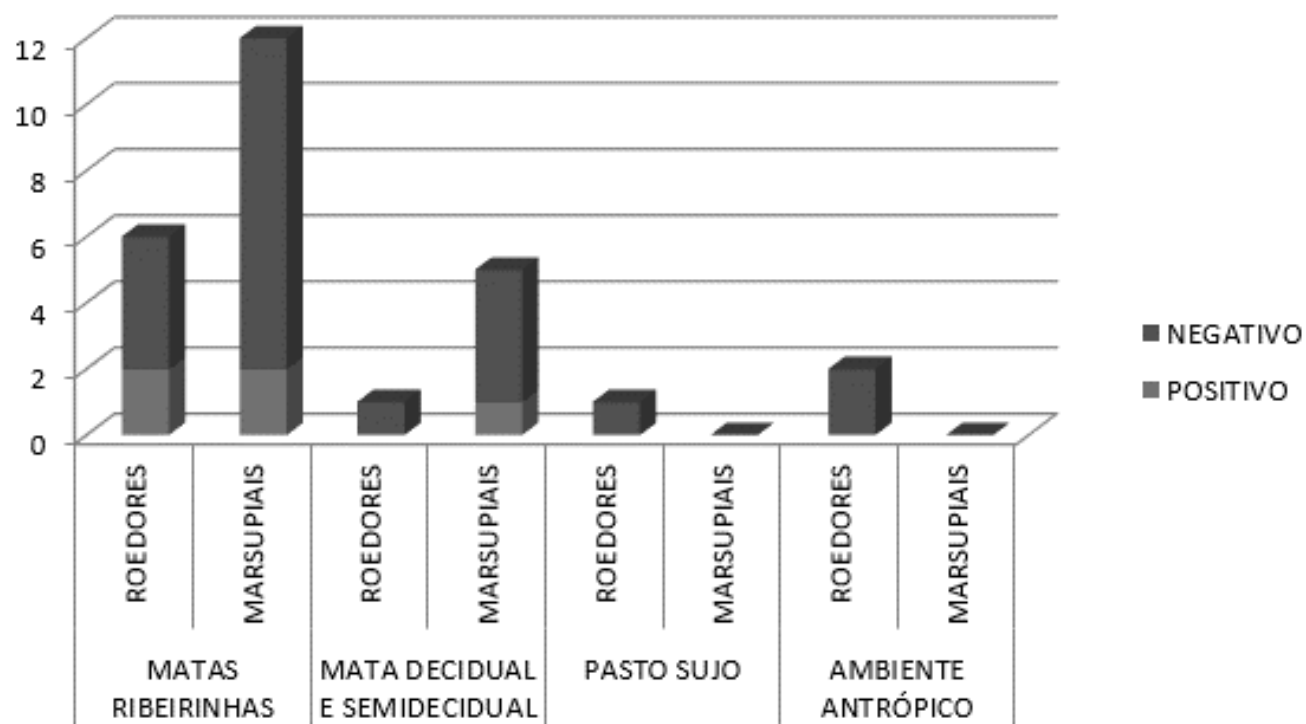
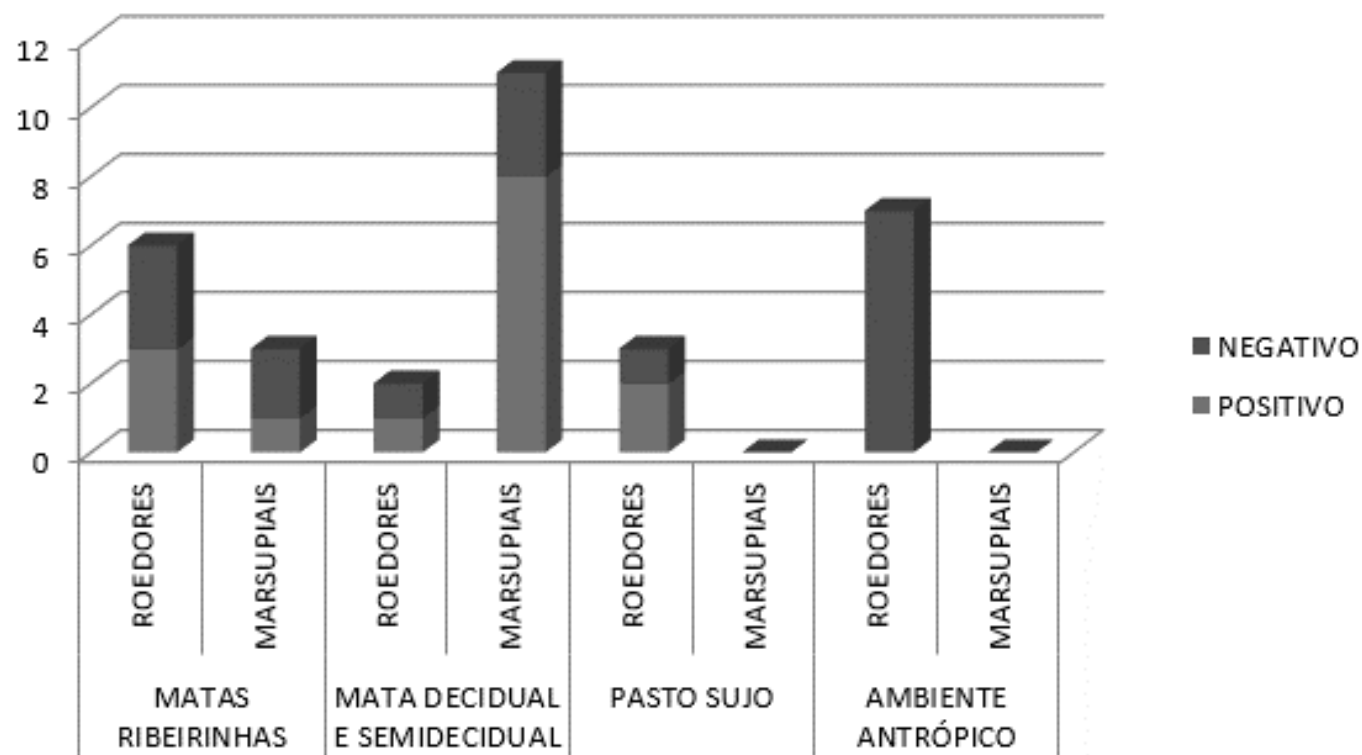


Figura 3. Distribuição de pequenos mamíferos não voadores capturados no Alto Paranaíba e positivos à PCR para o gene *lipL32* em seus respectivos ambientes de captura, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.

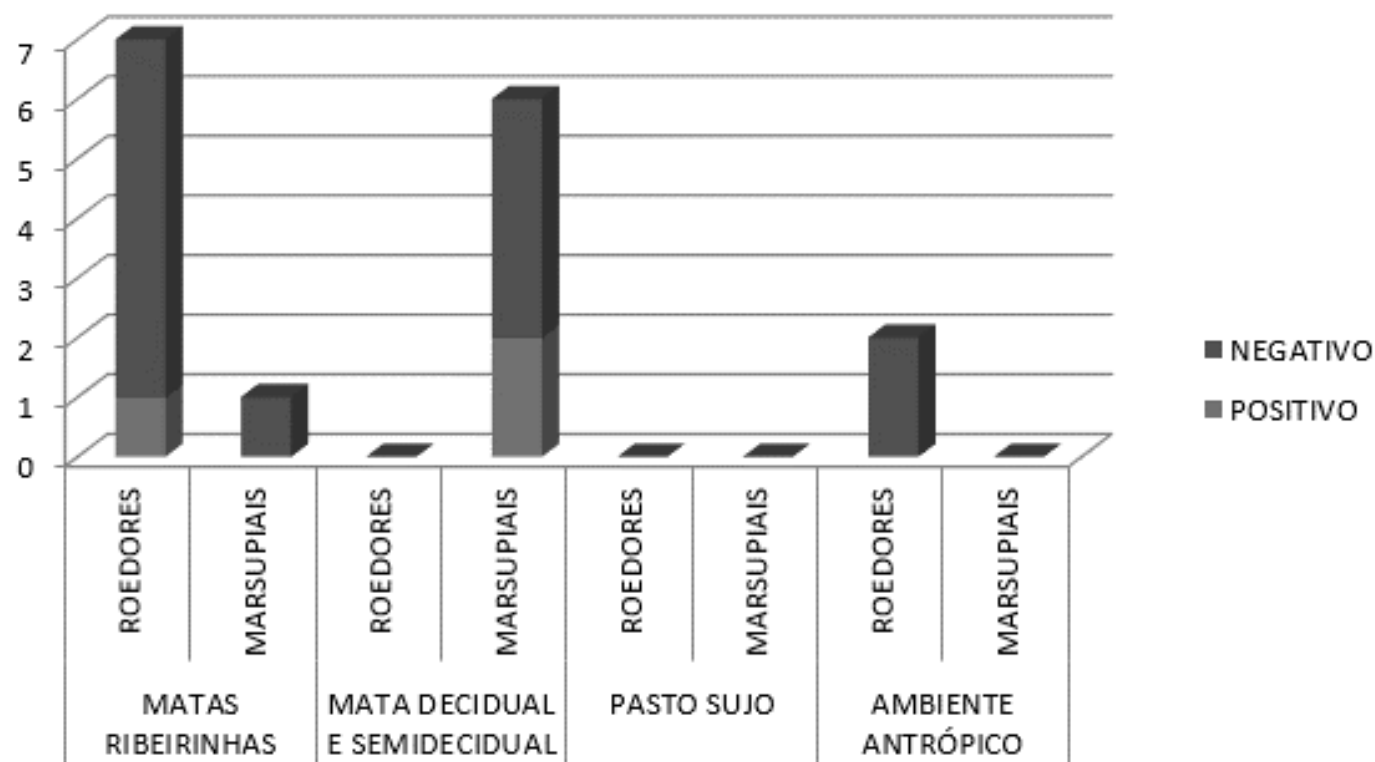


310

311

312 Figura 4. Distribuição de pequenos mamíferos não voadores capturados no Médio Paranaíba e positivos à PCR para o gene *lipL32* em seus  
 313 respectivos ambientes de captura, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.

314



315

316

317

318 Figura 5. Distribuição de pequenos mamíferos não voadores capturados no Baixo Paranaíba e positivos à PCR para o gene *lipL32* em seus  
 319 respectivos ambientes de captura, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.

No ambiente de Pasto Sujo houve apenas quatro capturas, e somente de roedores. Um espécime de *Cerradomys subflavus* no Alto Paranaíba e negativo na PCR, e três espécimes de *Calomys* sp. no Médio Paranaíba, em que dois deles eram portadores renais de *Leptospiras* patogênicas.

Para o local de instalação das armadilhas, pôde-se notar, numericamente, que houve mais pequenos mamíferos não voadores portadores renais (41,18%) capturados no solo do que nas árvores das matas (27,03%), com destaque para a frequência de marsupiais positivos à PCR e oriundos de armadilhas de solo (54,54%), seguidos pelos roedores positivos à PCR e também oriundos de armadilhas de solo (34,78%). Entre os marsupiais capturados nas armadilhas de árvores, 29,63% eram portadores renais de *Leptospiras* patogênicas, e 20% dos roedores capturados nas árvores, foram positivos à PCR (tabela 3).

Embora não tenha havido diferenças estatísticas significantes entre a frequência de pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR nas diferentes épocas de captura (final das chuvas e final da seca), observa-se uma tendência numérica no sucesso de captura de pequenos mamíferos não voadores entre as áreas de captura de cada época do ano. Nota-se que na área do Alto Paranaíba capturou-se 11 animais ao final do período chuvoso, e 16 ao final do período seco, o que demonstra uma aceitável paridade entre o número de capturados nas respectivas épocas do ano, quando comparado aos resultados de Médio (cinco capturas ao final do período chuvoso, e 23 capturas ao final do período seco) e Baixo Paranaíba (quatro capturas ao final do período chuvoso, e 12 capturas ao final do período seco).

Os dados sobre estação do ano podem ser observados na Tabela 3, os dados referentes a idade e sexo frente aos resultados de PCR estão descritos na Tabela 4, e dados sobre sucesso de captura estão ilustrados na Tabela 5.

345 Tabela 3. Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR do gene *lipL32* de *Leptospiras* patogênicas em seus respectivos locais  
 346 de instalação da armadilha, e estação do ano. Vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.

Pequenos mamíferos não voadores	Área de coleta	Capturas n	Local da armadilha		Estação de coleta					
			Árvore n	PCR (n/%)	Solo n	PCR (n/%)	Final do período chuvoso		Final do período seco	
							n	PCR (n/%)	n	PCR (n/%)
Roedores	Alto Paranaíba	10	1	0	9	3 (33,34)	4	2 (50)	6	0
	Médio Paranaíba	14	3	1 (33,33)	11	5 (45,46)	4	1 (25)	10	5 (50)
	Baixo Paranaíba	9	6	1 (16,67)	3	0	3	0	6	1 (16,66)
	Total roedores	33	10	2 (20)	23	8 (34,78)	11	3 (27,28)	22	6 (27,27)
Marsupiais	Alto Paranaíba	17	13	2 (15,39)	4	1 (25)	7	1 (14,29)	10	2 (20)
	Médio Paranaíba	14	8	4 (50)	6	5 (83,33)	1	0	13	9 (69,24)
	Baixo Paranaíba	8	6	2 (33,34)	1	0	1	0	6	2 (33,33)
	Total marsupiais	39	27	8 (29,63)	11	6 (54,54)	9	1 (11,11)	29	13 (49,83)
Total de Pequenos Mamíferos não voadores		72	37	10 (27,03)	34	14 (41,18)	20	3 (15)	51	19 (37,25)

347 Tabela 4. Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR do gene *lipL32* de *Leptospiras* patogênicas e ao MAT, em suas  
 348 respectivas categorias sexual e etária, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.

Pequenos		Capturas		PCR		MAT	
Mamíferos		n	n	%	n	%	
Roedor	Fêmea	16	5	31,25	0	0	
	Macho	18	5	27,77	0	0	
Marsupial	Fêmea	19	7	36,84	0	0	
	Macho	18	7	38,88	1	5,55	
Roedor	Jovem	8	2	25	0	0	
	Adulto	26	8	30,77	0	0	
Marsupial	Jovem	2	0	0	0	0	
	Adulto	35	14	40	1	2,86	

350 Tabela 5. Sucesso de captura de pequenos mamíferos não voadores em suas respectivas áreas e ambientes de captura, vale do rio Paranaíba, Brasil,  
 351 2016.

Área de Captura	Ambientes de Captura			
	Ambiente Antrópico (%)	Pasto Sujo (%)	Matas Deciduais e Semideciduais (%)	Matas Ribeirinhas (%)
Alto Paranaíba	3,13	0,78	1,5	4,5
Médio Paranaíba	4,69	2,34	3,25	2,25
Baixo Paranaíba	3,13	0	1,5	2,25

352

353

354

355

356

357

#### 4. Discussão

Sabe-se bem que os roedores e marsupiais são importantes reservatórios de *Leptospiras* patogênicas, pois se mantêm infectados por um longo período sem manifestar a doença, entretanto considera-se a ordem Rodentia como a principal delas na manutenção deste patógeno no ambiente, inclusive entre os animais selvagens (Adler e de la Peña Moctezuma, 2010; Andersen-Ranberg et al., 2016; Cheema et al., 2007; Costa et al., 2014; Da Silva et al., 2010; Faria et al., 2008; Nakamura et al., 2013; Reilly, 1970). Neste estudo, apenas um espécime de pequeno mamífero, *Gracilinanus agilis*, foi reagente ao MAT para leptospirose, e somente para o sorovar Australis no título de 100. Este animal também foi positivo à PCR, e capturado no ambiente de mata decídua e semidecídua, na região do Baixo Paranaíba.

Apesar de outros autores já terem demonstrado uma maior taxa de soroprevalência para leptospirose tanto em marsupiais, quanto em roedores (Bunnell et al., 2000; Costa et al., 2014; Desvars et al., 2013; Dos Santos Paixão et al., 2014; Faria et al., 2008; Lilenbaum et al., 1993; Stritof Majetic et al., 2014; Vieira et al., 2016; Villanueva et al., 2014; Yalin et al., 2011), já foi evidenciado em outras pesquisas que exames sorológicos em hospedeiros reservatórios tendem a uma menor sensibilidade. Podendo apresentarem títulos de anticorpos indetectáveis, devido à relação mais estreita durante o processo evolutivo de ambas espécies (hospedeiro e parasito). Neste processo a patogenicidade e virulência do agente etiológico ao hospedeiro é diminuída, bem como a resposta imunológica do hospedeiro à infecção do parasito (Ellis, 2015; Muthukkaruppan et al., 2007; Sunbul et al., 2001; Vinetz et al., 1996).

Até o presente momento nenhum estudo relatou a ocorrência de anticorpos anti-leptospira, nem de genes de *Leptospiras* patogênicas amplificados a partir de tecido renal ou urina, ou mesmo isolamento de *Leptospira* spp. na espécie *Gracilinanus agilis*. As



informações já produzidas em outras pesquisas relatam tais informações, em sua maioria, para os marsupiais gambás e *Caluromys*, que são considerados os carreadores e/ou reservatórios dos sorovares Castellonis, Brasiliensis, Bratislava, Andamana, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippytyphosa, Autumnalis, Wolffii e Bataviae (Fornazari et al., 2018; Jorge et al., 2012; Lins e Lopes, 1984; Silva, 2014; Vieira et al., 2017). Sorovares do sorogrupo Australis geralmente estão associados aos hospedeiros, em ambientes selvagens, da ordem dos Primatas e Cingulatas. E o sorovar Australis também já foi isolado do rato-d'água, *Nectomys squamipes* (Cordeiro et al., 1981; Corrêa, 2007; Santa Rosa et al., 1975).

Pesquisas envolvendo diagnóstico por PCR em tecido renal para estudo epidemiológico da infecção, ou de portadores renais de *Leptospiras* patogênicas em pequenos mamíferos não voadores são bastante escassos, principalmente nos biomas brasileiros. A PCR vem sendo mais utilizada para diagnósticos confirmatórios em animais já sabidamente reagentes ao MAT, ou com isolamento de alguma estirpe a partir de urina e tecidos, para espécies selvagens de mamíferos não marsupiais e roedores, ou especificamente entre roedores sinantrópicos (Bunnell et al., 2000; Costa et al., 2014; Desvars et al., 2013; Dos Santos Paixão et al., 2014; Fornazari et al., 2018; Jorge et al., 2012; Stritof Majetic et al., 2014; Vieira et al., 2017, 2016).

Em pesquisas já realizados na América Latina, empregando a mesma técnica de reação em cadeia da polimerase, identificaram-se em média 39% de positivos entre os didelfídeos, e 20% entre os roedores (Bunnell et al., 2000; Vieira et al., 2017). Em uma pesquisa semelhante, executado na China, dentre 38 roedores selvagens capturados e submetidos à PCR de rim com primer *lipL32*, apenas oito animais (16%) foram positivos. Neste estudo, para tecido renal de pequenos mamíferos não voadores, 33,33% foram positivos à PCR para gene *lipL32* (33,33% entre os didelfídeos, e 34,48% entre roedores).

Desta forma, verifica-se uma maior frequência de roedores portadores renais de *Leptospiras* patogênicas no vale do rio Paranaíba, quando comparados aos dados médios já descritos por outros autores.

Desta forma, identifica-se neste estudo o papel inédito dos *Gracilinanus agilis* como portadores renais e veiculadores de *Leptospiras* patogênicas no vale do rio Paranaíba, confirmado pelas técnicas diagnósticas da PCR e MAT. Além do ineditismo, reforça-se a importância do papel deste marsupial na cadeia epidemiológica da leptospirose no vale do rio Paranaíba, visto que dos 34 representantes dessa espécie que foram capturados nas três regiões de estudo, 41,18% (14 animais) foram confirmados como portadores renais pelo exame direto da PCR.

É importante frisar que o único animal deste estudo, *Gracilinanus agilis*, que apresentou aglutininas anti-*Leptospiras*, e para o sorovar Australis, foi comprovado como portador renal pelo método direto da PCR. Aventa-se a possibilidade de infecção por contato indireto deste espécime de *Gracilinanus agilis* com o ambiente contaminado por algum portador renal selvagem Primatas, Cingulados, *Nectomys squamipes*, ou mesmo animais domésticos como os bovinos, que tinham livre acesso ao ambiente onde se capturou este marsupial.

Não houve diferenças estatísticas significantes quando se comparou a frequência de roedores e marsupiais portadores renais de *Leptospiras* patogênicas. Desta forma, subentende-se que as duas espécies apresentam importâncias semelhantes na manutenção e veiculação de *Leptospiras* patogênicas no vale do rio Paranaíba, apesar de outros pesquisadores apontarem os roedores como principais reservatórios de *Leptospiras* patogênicas em ambiente silvestre (Adler e de la Peña Moctezuma, 2010; Andersen-Ranberg et al., 2016; Cheema et al., 2007; Costa et al., 2014; Da Silva et al., 2010; Faria et al., 2008; Nakamura et al., 2013; Reilly, 1970).

Entretanto houve diferenças estatísticas significantes para marsupiais infectados entre as áreas de coleta ( $p = 0,0086$ ), em que a frequência de animais portadores renais de *Leptospiras* patogênicas na área do Médio Paranaíba (64,29%) foi maior quando comparada à frequência de portadores renais das áreas do Alto Paranaíba (17,65%) e Baixo Paranaíba (16,67%). Uma possível justificativa para essa maior frequência de marsupiais portadores renais na área do Médio Paranaíba é o efeito borda, dado que nesta área de estudo verificou-se a composição de um mosaico entre áreas de pastagens e matas (deciduais, semideciduais e ribeirinhas), a que os bovinos tinham livre acesso. Essa composição de matriz vegetal, aliada ao pastoreio do gado, intensificou o efeito borda nos fragmentos de mata da área do Médio Paranaíba em relação as demais áreas de pesquisa, o que gerou uma alteração na estrutura da vegetação, compactando o solo, favorecendo a proliferação de espécies selvagens oportunistas e generalistas, por sua vez favorecendo a proliferação e dispersão de patógenos neste ambiente (Daszak et al., 2004; Primack e Rodrigues, 2001).

Os *Gracilinanus agilis* são animais arborícolas (Emmons e Feer, 1997), desta forma foram capturados somente nos ambientes com formação arbórea (mata estacional decidual e semidecidual, e matas ribeirinhas) com destaque para a mata estacional decidual e semidecidual, no Médio Paranaíba, onde dos 11 animais amostrados, 8 (72,72%) foram positivos à PCR. Quando se avalia a proporção de portadores renais entre os *Gracilinanus agilis* capturados na campanha do final da estação seca, 69,23% dos animais foram identificados como portadores renais.

Tais fatos podem ter aumentado o risco de infecção dos marsupiais na área do Médio Paranaíba, em detrimento das outras duas áreas de captura, visto que o risco de infecção depende da ecologia das espécies de hospedeiro, como área de vida, comportamento de forrageamento e contato com outros animais (Fornazari et al., 2018).

Em épocas secas do ano, poucos são os locais com água para hidratação dos animais, resultando em aglomeração e acesso de diferentes espécies em um só local de dessedentação.

E sabendo que *Gracilinanus agilis* apresentam uma dieta mais seletiva (insetívora), nota-se a necessidade desta espécie em ampliar sua área de forrageamento durante o período seco do ano (escassez de alimentos), aumentando assim contato com solo, e com diferentes ambientes. Desta forma são mais desafiados pelas Leptospiras eliminadas por outras espécies animais (selvagens ou domésticas), com *status* de portadoras renais, em sua área de vida, se tornando também portadores (Bagagli et al., 1998; Drancourt et al., 2006; Ko et al., 1999; Martins et al., 2006; Neto e Ramos-Elorduy, 2006; Pinheiro et al., 2002; Sarkar et al., 2002).

*Gracilinanus agilis* é uma espécie que se reproduz por semelparidade, ou seja, possuem um único evento reprodutivo, seguido da morte de seus indivíduos. Esses didelfídeos apresentam em média 1,3 anos de vida, em que os machos adultos morrem todos até dezembro de cada ano. É entre os meses de agosto a outubro que esses animais manifestam pior condição corporal, se tornando mais susceptíveis a infecções e parasitismos (Lopes e Leiner, 2015). Essa característica própria da espécie pode explicar uma maior frequência destes animais positivos à PCR ao final do período seco (campanhas de captura realizadas no mês de setembro), em que, dos 13 espécimes de *Gracilinanus agilis* positivos à PCR, 9 (69,23%) eram machos adultos.

Se considerarmos que não houve diferença estatística significativa entre a frequência de jovens e adultos diagnosticados como portadores renais, e ponderando que o tempo médio de vida de *Gracilinanus agilis* seja tão curto, e mesmo assim apresentaram frequências tão consideráveis de portadores renais, pode-se inferir o alto desafio que esse

ambiente oferece aos pequenos mamíferos não voadores, demonstrando o alto grau de contaminação das áreas estudadas.

Entre as nove espécies de roedores capturadas, cinco apresentavam pelo menos um de seus espécimes como portador renal de *Leptospiras* patogênicas, com exceção da espécie *Cerradomys subflavus* (três Alto Paranaíba e um no Baixo Paranaíba) e *Rhipidomys* sp. (um espécime no Alto Paranaíba) em que nenhum de seus representantes capturados foram positivos à PCR. A espécie com maior número de indivíduos capturados foi *Oecomys bicolor*, totalizando 10 animais, com dois positivos à PCR. A área com captura de maior número de indivíduos dessa espécie foi o Baixo Paranaíba (sete capturados, um portador renal), seguido pela área do Médio Paranaíba (três capturados, um portador renal).

*Oecomys bicolor* trata-se de uma espécie arborícola, que habita as áreas florestais da Amazônia, de Mata Atlântica, além de matas de galeria e formações florestais do Cerrado e do Pantanal. Apresenta hábito noturno, e é comumente capturado em vegetações com lianas (Bonvicino et al., 2008; Emmons e Feer, 1997). Foi a espécie de roedor com menor frequência de indivíduos identificados como portadores renais de *Leptospiras* patogênicas (20%), o que pode ser explicado por seu comportamento mais arborícola, desta forma não apresenta grande contato com o solo e poças d'água, que geralmente estão associados a fatores de risco para infecções pelo contato indireto nos ambientes rural e silvestre (Bagagli et al., 1998; Drancourt et al., 2006; Fornazari et al., 2018).

Uma outra espécie de roedor selvagem identificada como portadora renal foi *Hylaeamys megacephala* (3 positivos na PCR), com quatro espécimes capturados em armadilhas de solo, em matas decidual e semidecidual (um animal) e matas ribeirinhas (três animais), especificamente na área do Médio Paranaíba. Se caracteriza por ser uma

espécie terrestre que habita formações florestais e vegetações abertas de Cerrado, Mata Atlântica, Floresta Amazônica, Caatinga e Pantanal (Bonvicino et al., 2008). E propriamente por seu comportamento terrestre, pode-se inferir que esta espécie está continuamente exposta e desafiada por sítios contaminados por *Leptospira* spp. (solo e poças d'água) a partir da urina de outros portadores renais (Bagagli et al., 1998; Drancourt et al., 2006; Fornazari et al., 2018).

Foram capturados quatro espécimes de *Calomys* sp., três oriundos da área do Médio Paranaíba (três exemplares, dois positivos à PCR) e um do Alto Paranaíba, capturado no ambiente antrópico, e identificado como não portador renal. Essa espécie é terrestre, habita formações florestais e abertas da Caatinga, do Cerrado e do Pantanal, além de algumas formações florestais da Mata Atlântica em seu limite com o Cerrado (Bonvicino et al., 2008). Os dois representantes desta espécie, identificados como portadores renais de Leptospiras, foram capturados no ambiente de pasto sujo, que margeava a borda da mata, e que representava um importante local de interface entre a área de vida das espécies de pequenos mamíferos não voadores selvagens e dos bovinos.

Outra característica importante do gênero *Calomys* é a sua considerável área de vida, em média de 0,32 hectares, o que implica tanto num maior desafio desses animais a infecções a partir do ambiente (solo), e mesmo a dispersão de Leptospiras a partir daqueles indivíduos portadores renais, dessa espécie. Verificou-se o comportamento sinantrópico de *Calomys* sp. neste estudo, e embora tenha sido negativo à PCR, é evidenciada a importância da vigilância epidemiológica destes animais para compreensão e predição de possíveis casos humanos. Sendo assim esses animais se configuram como importantes agentes eliminadores de Leptospiras nesse ambiente, incrementando o risco de infecção tanto de bovinos, quanto das demais espécies selvagens ali coabitantes (Bagagli et al., 1998; Drancourt et al., 2006; Fornazari et al., 2018; Rocha et al., 2016).

As outras duas espécies de roedores capturadas no vale do rio Paranaíba, que também foram positivas à PCR, *Akodon* sp. e *Nectomys squamipes*, já foram relatadas como portadoras renais de *Leptospiras* patogênicas por isolamento desde a década de 1960 (Corrêa et al., 1965-67; Santa Rosa et al., 1975). *Akodon* sp. é característico de ambientes de Mata Atlântica e/ou com influência Atlântica, como é o caso do vale do rio Paranaíba. Três representantes dessa espécie foram coletados na área do Alto Paranaíba, em armadilhas de solo e ambiente de matas ribeirinhas, e um deles foi caracterizado como portador renal pela PCR. A espécie *Nectomys squamipes* também foi capturada na área do Alto Paranaíba (dois espécimes), e na área do Médio Paranaíba (um espécime) em ambiente de matas ribeirinhas, e todos foram positivos à PCR.

*Nectomys squamipes* são ratos semiaquáticos, conhecidos como rato-d'água, e pela característica de seu ambiente de vida, os mesmos se tornam mais susceptíveis ao contato com água contaminada por urina de outros animais portadores renais, aumentando seu risco de infecção. Também constituem uma importante interface entre os ambientes aquático e terrestre, promovendo a circulação de *Leptospiras* patogênicas entre os dois ecossistemas (Bonvicino et al., 2008; Cordeiro et al., 1981; Emmons e Feer, 1997; Fávero et al., 2017; Ko et al., 1999; Martins et al., 2006; Pinheiro et al., 2002; Ramos, 2007; Sarkar et al., 2002).

Geralmente a frequência de portadores renais está relacionada à idade e ao sexo, em que pequenos mamíferos não voadores machos e adultos apresentam-se em maiores taxas de prevalência para os diferentes métodos de diagnósticos geralmente utilizados (MAT, PCR, isolamento) (Desvars et al., 2013; Easterbrook et al., 2007; Fornazari et al., 2018; Himsworth et al., 2013; Krojgaard et al., 2009).

Um dos fatores que influenciam no sucesso de captura de pequenos mamíferos não voadores em ambiente de Cerrado é justamente a época do ano. Durante o período

chuvoso existe maior disponibilidade de alimentos no ambiente, o que implica em um menor trabalho para roedores e marsupiais em consegui-los, resultando até na diminuição de suas áreas de vida. Já no período seco essa disponibilidade de alimentos diminui, e os animais precisam forragear e se arriscar mais para se alimentar, além do que se nota uma maior atividade de machos por ser a ocasião de acasalamento (Rocha et al., 2016; Vieira, 1997). Por isso verificou-se uma maior abundância de pequenos mamíferos não voadores ao final da estação seca, com um maior número de animais capturados nas três áreas de estudo.

Entretanto, na área do Alto Paranaíba nota-se uma menor discrepância entre o número de animais capturados nas diferentes épocas do ano (11 animais na estação chuvosa, e 16 na estação seca), bem como para frequência de portadores renais (três animais em cada estação). Credita-se esse fato a características próprias deste ambiente, o qual possuía uma matriz de matas mais úmidas, em que não se notou tanta diferenciação na sua cobertura foliar e na umidade da liteira.

Considerando que a PCR seja apontada como adequada técnica epidemiológica para detecção de reservatórios (Dos Santos Paixão et al., 2014; Faria et al., 2008; Vieira et al., 2016), acredita-se que os pequenos mamíferos não voadores se configuram como agentes de destaque na epidemiologia da leptospirose no vale do rio Paranaíba.

Desta forma verificou-se que pequenos mamíferos não voadores são importantes reservatórios, cumprindo um papel de veiculadores de *Leptospiras* patogênicas no vale do rio Paranaíba, principalmente aquelas espécies capazes de promover uma interface entre os diferentes ambientes estudados (*Calomys* sp., *Nectomys squamipes*), ou mesmo que apresentaram uma alta frequência de portadores renais, como *Gracilinanus agilis*. Pôde-se observar que estes marsupiais, independentemente da intensidade da ação antrópica nos ambientes florestados das áreas estudadas, se mostraram importantes



mantenedores e veiculadores de *Leptospiras* patogênicas. Acredita-se ser o primeiro relato da identificação, via PCR, de *Gracilinanus agilis*, *Calomys* sp., *Hylaeamys megacephala* e *Oecomys bicolor* como portadores renais e veiculadores de *Leptospiras* patogênicas.

## Referências Bibliográficas

- Adler, B., de la Peña Moctezuma, A., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. Vet. Microbiol. 140, 287–296. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012
- Agência Nacional de Águas, 2013. Plano de Recursos Hídricos e do Enquadramento dos Corpos Hídricos Superficiais da Bacia Hidrográfica do Rio Paranaíba.
- Akande, O.A., 2011. A study on wild rat behaviour and control on a pig farm. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Andersen-Ranberg, E.U., Pipper, C., Jensen, P.M., 2016. Global Patterns of *Leptospira* Prevalence in Vertebrate Reservoir Hosts. J. Wildl. Dis. 52, 468–477. doi:10.7589/2014-10-245
- Backhans, A., Jacobson, M., Hansson, I., Lebbad, M., Lambertz, S.T., Gammelgård, E., Saager, M., Akande, O., Fellström, C., 2013. Occurrence of pathogens in wild rodents caught on Swedish pig and chicken farms. Epidemiol. Infect. 141, 1885–1891. doi:10.1017/S0950268812002609
- Bagagli, E., Sano, A., Coelho, K.I., Alquati, S., Miyaji, M., De Camargo, Z.P., Gomes, G.M., Franco, M., Montenegro, M.R., 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58, 505–512. doi:10.4269/ajtmh.1998.58.505
- Bonvicino, C.R., Oliveira, J. a De, Nacional, M., 2008. Guia dos roedores do Brasil , com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Biologia (Bratisl). 15, 120. doi:10.1590/S0031-10492003000600001
- Brooks, T.M., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B., Rylands, A.B., Konstant, W.R., Flick, P., Pilgrim, J., Oldfield, S., Magin, G., Hilton-Taylor, C., 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. Conserv. Biol. 16, 909–923. doi:10.1046/j.1523-1739.2002.00530.x
- Brownstein, J.S., Holford, T.R., Fish, D., 2003. A climate-based model predicts the spatial distribution of the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in the United States. Environ. Health Perspect. doi:10.1289/ehp.6052
- Bunnell, J.E., Hice, C.L., Watts, D.M., Montrueil, V., Tesh, R.B., Vinetz, J.M., 2000. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. Am. J. Trop. Med. Hyg. 63, 255–8.
- Cheema, P.S., Srivastava, S.K., Amutha, R., Singh, S., Singh, H., Sandey, M., 2007. Detection of pathogenic leptospires in animals by PCR based on lipL21 and lipL32 genes. Indian J. Exp. Biol. 45, 568–573.
- Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2013. Guia brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais. Brasília.
- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, (CONCEA), 2013. Diretrizes brasileiras para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA. Brasília.
- Cordeiro, F., Sulzer, C.R., Ramos, A.D.A., Almeida, R.A. De, 1981. *Leptospira interrogans* in several wildlife species in southeast Brazil. Pesqui. Vet. Bras. 1, 19–29; 28 ref.
- Corrêa, M.O., Hyakutake, S., Natale, V., Galvão, P.A., Aguiar, H., n.d. Estudos sobre *Leptospira Wolffi* em São Paulo. Rev. do Inst. Adolfo Lut 11, 25–27.
- Corrêa, S.H.R., 2007. Leptospirose, in: Roca (Ed.), Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária. São Paulo, pp. 736–741.
- Costa, F., Porter, F.H., Rodrigues, G., Farias, H., de Faria, M.T., Wunder, E.A., Osikowicz, L.M., Kosoy, M.Y., Reis, M.G., Ko, A.I., Childs, J.E., 2014. Infections

- by *Leptospira interrogans*, Seoul Virus, and *Bartonella* spp. Among Norway Rats (*Rattus norvegicus*) from the Urban Slum Environment in Brazil. Vector-Borne Zoonotic Dis. 14, 33–40. doi:10.1089/vbz.2013.1378
- Da Silva, E.F., Félix, S.R., Cerqueira, G.M., Fagundes, M.Q., Neto, A.C.P.S., Grassmann, A.A., Amaral, M.G., Gallina, T., Dellagostin, O.A., 2010. Short report: Preliminary characterization of *Mus musculus*-derived pathogenic strains of *Leptospira borgpetersenii* serogroup Ballum in a hamster model. Am. J. Trop. Med. Hyg. 83, 336–337. doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0120
- Daszak, P., Tabor, G.M., Kilpatrick, A.M., Epstein, J., Plowright, R., 2004. Conservation medicine and a new agenda for emerging diseases, in: Annals of the New York Academy of Sciences. pp. 1–11. doi:10.1196/annals.1307.001
- de Souza, M.A., de Castro, J.R., Moreira, R.Q., Bombonato, N.G., Soares, P.M., Correia Lima, A.M., 2016. Anti-*Leptospira* spp. Antibodies in Several Animal Species on the Same Farm. Biosci. J. 32, 202–207.
- Desvars, A., Michault, A., Chiroleu, F., 2013. Influence of risk factors on renal leptospiral load in naturally infected wild black rats. Acta Trop. 125, 258–261. doi:10.1016/j.actatropica.2012.11.011
- Dos Santos Paixão, M., Alves-Martin, M.F., Tenório, M. da S., Starke-Buzetti, W.A., Alves, M.L., da Silva, D.T., Ferreira, A.G., e Silva, M.F., Sousa, L.O., Lucheis, S.B., 2014. Serology, isolation, and molecular detection of *Leptospira* spp. from the tissues and blood of rats captured in a wild animal preservation centre in Brazil. Prev. Vet. Med. 115, 69–73. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.03.016
- Drancourt, M., Houhamdi, L., Raoult, D., 2006. *Yersinia pestis* as a telluric, human ectoparasite-borne organism. Lancet Infect. Dis. doi:10.1016/S1473-3099(06)70438-8
- Easterbrook, J.D., Kaplan, J.B., Vanasco, N.B., Reeves, W.K., Purcell, R.H., Kosoy, M.Y., Glass, G.E., Watson, J., Klein, S.L., 2007. A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA. Epidemiol. Infect. 135, 1192–1199. doi:10.1017/S0950268806007746
- Ellis, W.A., 2015. Animal Leptospirosis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 387, 99–137. doi:10.1007/978-3-662-45059-8\_6
- Ellis, W.A., O'Brien, J.J., Neill, S.D., Hanna, J., 1982. Bovine leptospirosis: serological findings in aborting cows. Vet. Rec. 110, 178–80. doi:10.1136/vr.110.8.178
- Emmons, L., Feer, F., 1997. Neotropical rainforest mammals: a field guide.
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P., 1999. Clinical laboratory diagnosis of leptospirosis, *Leptospira* and Leptospirosis.
- Faria, M.T. de, Calderwood, M.S., Athanazio, D.A., McBride, A.J.A., Hartskeerl, R.A., Pereira, M.M., Ko, A.I., Reis, M.G., 2008. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. Acta Trop. 108, 1–5. doi:10.1016/j.actatropica.2008.07.005
- Fávero, J.F., de Araújo, H.L., Lilenbaum, W., Machado, G., Tonin, A.A., Baldissera, M.D., Stefani, L.M., Da Silva, A.S., 2017. Bovine leptospirosis: prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. Microb. Pathog. 107, 149–154.
- Fish, D., 1995. Environmental risk and prevention of Lyme disease. Am. J. Med. 98, 2S–9S. doi:10.1016/S0002-9343(99)80038-2
- Fornazari, F., Langoni, H., Marson, P.M., Nóbrega, D.B., Teixeira, C.R., 2018. *Leptospira* reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents. Acta Trop. 178, 205–212. doi:10.1016/j.actatropica.2017.11.019
- Himsworth, C.G., Bidulka, J., Parsons, K.L., Feng, A.Y.T., Tang, P., Jardine, C.M.,

- Kerr, T., Mak, S., Robinson, J., Patrick, D.M., 2013. Ecology of *Leptospira interrogans* in Norway rats (*Rattus norvegicus*) in an inner-city neighborhood of Vancouver, Canada. PLoS Negl. Trop. Dis. 7. doi:10.1371/journal.pntd.0002270
- Instituto Nacional de Pesquisa Espacial, (INPE), 2016. Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos [WWW Document]. URL [www.cptec.inpe.br/cidades](http://www.cptec.inpe.br/cidades) (accessed 2.3.17).
- Jorge, S., Hartleben, C.P., Seixas, F.K., Coimbra, M.A.A., Stark, C.B., Larrondo, A.G., Amaral, M.G., Albano, A.P.N., Minello, L.F., Dellagostin, O.A., Brod, C.S., 2012. *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum (*Didelphis albiventris*): First isolation in Brazil. Acta Trop. 124, 147–151. doi:10.1016/j.actatropica.2012.07.009
- Ko, A.I., Galvão Reis, M., Ribeiro Dourado, C.M., Johnson, W.D., Riley, L.W., 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Lancet 354, 820–825. doi:10.1016/S0140-6736(99)80012-9
- Köppen, W., 1948. Climatologia. México. Fundo Cult. Econômica.
- Krojgaard, L.H., Villumsen, S., Markussen, M.D.K., Jensen, J.S., Leirs, H., Heiberg, A.C., 2009. High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*). Epidemiol. Infect. 137, 1586–1592. doi:10.1017/S0950268809002647
- Lee, G., Goosens, K.A., 2015. Sampling Blood from the Lateral Tail Vein of the Rat. J. Vis. Exp. doi:10.3791/52766
- Lilenbaum, W., Ribeiro, V., Martin, E., Bispo, V., 1993. Estudo sorológico para detecção de anticorpos anti-leptospira em *Rattus norvegicus* de Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil. Rev. Latinoam. Microbiol. 35, 357–380.
- Lins, Z.C., Lopes, M.L., 1984. Isolation of *Leptospira* from wild forest animals in Amazonian Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 78, 124–126. doi:10.1016/0035-9203(84)90191-3
- LoGiudice, K., Ostfeld, R.S., Schmidt, K.A., Keesing, F., 2003. The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 567–71. doi:10.1073/pnas.0233733100
- Lopes, G.P., Leiner, N.O., 2015. Semelparity in a population of *gracilinanus agilis* (*Didelphimorphia*: *Didelphidae*) inhabiting the Brazilian cerrado. Mamm. Biol. 80, 1–6. doi:10.1016/j.mambio.2014.08.004
- Magajevski, F.S., Silva Girio, R.J., Mathias, L.A., Myashiro, S., Genovez, M.É., Scarcelli, E.P., 2005. Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. Brazilian J. Microbiol. 36, 43–47. doi:10.1590/S1517-83822005000100009
- Martins, E.G., Bonato, V., Pinheiro, A., dos Reis, S.F., 2006. Variation in the food-niche width of *Gracilinanus microtarsus* (*Didelphimorphia*: *Didelphidae*) in a cerrado remnant in south-eastern Brazil. Mamm. Biol. 71, 304–308. doi:10.1016/j.mambio.2006.03.001
- Miller, R.S., Farnsworth, M.L., Malmberg, J.L., 2013. Diseases at the livestock-wildlife interface: Status, challenges, and opportunities in the United States. Prev. Vet. Med. 110, 119–132. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.11.021
- Muthukkaruppan, V., Hartskeerl, R., Priya, C., Hoogendijk, K., Berg, M., Rathinam, S., Ahmed, A., 2007. Field rats form a major infection source of leptospirosis in and around Madurai, India. J. Postgrad. Med. 53, 236. doi:10.4103/0022-3859.37511
- Nakamura, I., Hang-Ombe, B.M., Sawa, H., Kobayashi, S., Orba, Y., Ishii, A., Thomas, Y., Isozumi, R., Yoshimatsu, K., Mweene, A.S., Takada, A., Sugimoto, C., Arikawa, J., 2013. Cross-Reactivity of Secondary Antibodies against African

- Rodents and Application for Sero-Surveillance. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 819–825. doi:10.1292/jvms.12-0471
- Neto, E.M.C., Ramos-Elorduy, J., 2006. Los Insectos Comestibles De Brasil: Etnicidad, Diversidad E Importancia En La Alimentación. *Boletín Soc. Entomológica Aragon.* 38, 1–38.
- Oliveira-Filho, A.T., Ratter, J.A., 2002. Vegetation Physiognomies and Wood Flora of the Cerrado Biome, in: *The Cerrados of Brazil*. pp. 91–120. doi:10.1663/0013-0001(2003)057[0656:DFABRE]2.0.CO;2
- Ostfeld, R.S., Keesing, F., 2000. Biodiversity and disease risk: The case of Lyme disease. *Conserv. Biol.* doi:10.1046/j.1523-1739.2000.99014.x
- Pardini, R., 2004. Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest landscape. *Biodivers. Conserv.* 13, 2567–2586. doi:10.1023/B:BIOC.0000048452.18878.2d
- Pinheiro, F., Diniz, I.R., Coelho, D., Bandeira, M.P.S., 2002. Seasonal pattern of insect abundance in the Brazilian cerrado. *Austral Ecol.* 27, 132–136. doi:10.1046/j.1442-9993.2002.01165.x
- Primack, R.B., Rodrigues, E., 2001. *Biologia da conservação*, Editora Planta. doi:10.4257/oeco.2009.1303.01
- Prusinski, M.A., Chen, H., Drobnack, J.M., Kogut, S.J., Means, R.G., Howard, J.J., Oliver, J., Lukacik, G., Backenson, P.B., White, D.J., 2006. Habitat Structure Associated with *Borrelia burgdorferi* Prevalence in Small Mammals in New York State. *Environ. Entomol.* 35, 308–319. doi:10.1603/0046-225X-35.2.308
- R Development Core Team, 2016. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Found. Stat. Comput. Vienna Austria 0, {ISBN} 3-900051-07-0. doi:10.1038/sj.hdy.6800737
- Ramos, V.D.N., 2007. *Ecologia alimentar de pequenos mamíferos de áreas de cerrado no sudeste do Brasil*. (2007), 68.f. *Ecol. Aliment. pequenos mamíferos áreas cerrado no sudeste do Bras. Mestr. em Ecol. e Conserv. Recur. Naturais. Univ. Fed. Uberlândia, Uberlândia*.
- Ratter, J.A., Ribeiro, J.F., Bridgewater, S., 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Ann. Bot.* 80, 223–230. doi:10.1006/anbo.1997.0469
- Reilly, J.R., 1970. The susceptibility of five species of wild animals to experimental infection with *Leptospira grippotyphosa*. *J. Wildl. Dis.* 6, 289–294. doi:10.7589/0090-3558-6.4.289
- Rocha, C.R., Ribeiro, R., Marinho-Filho, J., 2016. Seasonal variations and population parameters explaining the use of space of neotropical rodents. *Mamm. Biol.* 81, 551–557. doi:10.1016/j.mambio.2016.07.043
- Santa Rosa, C.A., Sulzer, C.R., Giorgi, W., da Silva, A.S., Yanaguita, R.M., Lobao, A.O., 1975. Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of a new serotype in the pyrogenes group. *Am. J. Vet. Res.* 36, 1363–1365.
- Sarkar, U., Nascimento, S.F., Barbosa, R., Martins, R., Nuevo, H., Kalafanos, I., Grunstein, I., Flannery, B., Dias, J., Riley, L.W., Reis, M.G., Ko, A.I., 2002. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 605–610. doi:10.4269/ajtmh.2002.66.605
- Silva, F.J. da, 2014. *Epidemiologia da infecção por Leptospira spp. em áreas rurais nos biomas brasileiros*.
- Stritof Majetic, Z., Galloway, R., Ruzic Sabljic, E., Milas, Z., Mojcec Perko, V., Habus, J., Margaletic, J., Pernar, R., Turk, N., 2014. Epizootiological survey of small mammals as *Leptospira* spp. reservoirs in Eastern Croatia. *Acta Trop.* 131, 111–

116. doi:10.1016/j.actatropica.2013.12.009
- Sunbul, M., Esen, S., Leblebicioglu, H., Hokelek, M., Pekbay, A., Eroglu, C., 2001. *Rattus norvegicus* acting as reservoir of leptospira interrogans in the Middle Black Sea region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to *Leptospira* strain. *Scand. J. Infect. Dis.* 33, 896–898. doi:10.1080/00365540110076796
- Thiermann, A.B., 1980. Canine leptospirosis in Detroit. *Am. J. Vet. Res.* 41, 1659–1661.
- Vieira, A.S., Narduche, L., Martins, G., Schabib Péres, I.A.H.F., Zimmermann, N.P., Juliano, R.S., Pellegrin, A.O., Lilenbaum, W., 2016. Detection of wild animals as carriers of *Leptospira* by PCR in the Pantanal biome, Brazil. *Acta Trop.* 163, 87–89. doi:10.1016/j.actatropica.2016.08.001
- Vieira, A.S., Pinto, P.S., Lilenbaum, W., 2017. A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. *Trop. Anim. Health Prod.* 1–10. doi:10.1007/s11250-017-1429-y
- Vieira, M.V., 1997. Dynamics of a rodent assemblage in a cerrado of southeast Brazil. *Rev. Bras. Biol.*
- Villanueva, S.Y.A.M., Saito, M., Baterna, R.A., Estrada, C.A.M., Rivera, A.K.B., Dato, M.C., Zamora, P.R.F.C., Segawa, T., Cavinta, L.L., Fukui, T., Masuzawa, T., Yanagihara, Y., Gloriani, N.G., Yoshida, S. ichi, 2014. *Leptospira*-rat-human relationship in Luzon, Philippines. *Microbes Infect.* 16, 902–910. doi:10.1016/j.micinf.2014.07.001
- Vinetz, J.M., Glass, G.E., Flexner, C.E., Mueller, P., Kaslow, D.C., 1996. Sporadic Urban Leptospirosis. *Ann. Intern. Med.* 125, 794–798. doi:10.3402/jchimp.v1i1.7042
- Yalin, W., Lingbing, Z., Hongliang, Y., Jianmin, X., Xiangyan, Z., Xiaokui, G., Utpal, P., Jinhong, Q., 2011. High prevalence of pathogenic *Leptospira* in wild and domesticated animals in an endemic area of China. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4, 841–845. doi:10.1016/S1995-7645(11)60205-8

835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859

### **CAPÍTULO 3**

#### **Papel de marsupiais e roedores na manutenção e veiculação de leptospiros patogênicas em rebanho bovino com leptospirose**

**Papel de marsupiais e roedores na manutenção e veiculação de leptospirosas patogênicas em rebanho bovino com leptospirose**

**Resumo**

A leptospirose é uma doença cosmopolita de maior ocorrência em regiões quentes e úmidas, que favorecem a sobrevivência da bactéria no ambiente. Objetivou-se investigar o papel de pequenos mamíferos não voadores selvagens e sinantrópicos na ecologia da leptospirose em uma propriedade rural produtora de leite na região sudeste do estado de Goiás, compreendida em área de Cerrado sob influência atlântica. Aplicou-se a técnica da aglutinação microscópica (MAT) e PCR (gene *lipL32*), para identificação dos reservatórios. Foram estudados 28 pequenos mamíferos não voadores, 14 marsupiais e 14 roedores. Nenhum animal reagiu ao MAT, entretanto 53,57% dos pequenos mamíferos foram positivos à PCR, 64,29% dos marsupiais e 42,86% dos roedores. Bovinos da mesma propriedade reagiram principalmente para estirpes pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, seguidos pelos sorogrupos Sejroe e Tarassovi. Pequenos mamíferos não voadores desempenham relevante papel na ecologia da leptospirose na propriedade estudada. Esses se confirmaram como importantes vias de manutenção e circulação de leptospirosas patogênicas neste ambiente, favorecendo a infecção das espécies comunicantes, como os bovinos.

**Palavras-chave:** *Gracilinanus agilis*. *lipL32*. Cerrado. Bovinos. Ecologia. Ambiente.

**1. Introdução**

A leptospirose é uma doença cosmopolita de maior ocorrência em regiões quentes e úmidas, que favorecem a sobrevivência da bactéria no ambiente. É transmitida entre mamíferos por contato direto entre animais infectados e pela exposição a água, solo e



alimentos contaminados com a urina de animais portadores renais de *Leptospira* spp. No Brasil, o endemismo dessa doença favorece a exposição da população humana a ambientes contaminados e animais infectados, tanto selvagens quanto sinantrópicos e domésticos, representando uma ameaça persistente a saúde pública (de Souza et al., 2016; Faine et al., 1999; Levett et al., 2015).

No Brasil, os pequenos mamíferos não voadores detêm o maior número de espécies dentro da classe Mammalia. São representados principalmente pelos roedores e marsupiais, que apresentam tanto espécies com ampla distribuição, quanto aquelas de ocorrência restrita a algumas áreas (Emmons e Feer, 1997; Fonseca et al., 1996). Os pequenos mamíferos, tanto nas espécies selvagens quanto nas sinantrópicas, já foram caracterizados como importantes reservatórios de sorovares patogênicos de leptospiros.

Sorovariedades do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, de grande importância zoonótica, foram descritas sendo albergadas e disseminadas por ratos-de-esgoto (*Rattus norvegicus*). O sorovar Australis foi isolado de rato-d'água (*Nectomys squamipes*), e os sorovares Bataviae, Ballum, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Castellonis apresentam como reservatórios espécies da família Didelphidae, representada pelos gambás (Cordeiro et al., 1981; Corrêa, 2007; Jorge et al., 2012; Langoni et al., 2008).

O bioma Cerrado é o segundo maior do Brasil, cobrindo originalmente cerca de 2 milhões de km<sup>2</sup>, o que corresponde a 23% do território do país (Oliveira-Filho e Ratter, 2002). Mais da metade da área original tornou-se pastagens e culturas nos últimos 35 anos, restando apenas 20% de sua área original (Mittermeier et al., 1999). Isso chama a atenção para um contato cada vez mais íntimo entre os animais de produção, roedores sinantrópicos, humanos, e as espécies de pequenos mamíferos selvagens, fato que intensifica o fluxo de *Leptospira* spp. no ambiente rural, aumentando o risco ocupacional

da leptospirose para humanos (Akande, 2011; Backhans et al., 2013; Miller et al., 2013; Silva, 2014).

A porção sudeste do estado de Goiás, região limítrofe banhada pelo rio Paranaíba, está predominantemente inserida no bioma Cerrado, entretanto se caracteriza por uma região de ecótono, devido a ocorrência também de manchas características de Mata Atlântica. Em função de atividades antrópicas nesta região, como a bovinocultura, 58% da área de Mata Atlântica e 74,3% da área de Cerrado já foram desmatadas (Agência Nacional de Águas, 2013). Nesse sentido, tal localidade é uma área sujeita a forte e constante perda de hábitat, com alterações que podem afetar todas as relações entre flora, fauna e microbiota associada. Assim, avaliar e acompanhar as interações entre hospedeiros, agentes infecciosos e ambiente nessa área, torna-se de grande valor quando consideramos o conceito de saúde única, na compreensão da dinâmica dessas relações.

Determinantes de doenças são características que afetam a saúde de uma população. O conhecimento destes, facilitam a identificação das categorias de animais que estão particularmente em risco de desenvolver doença. Os determinantes associados ao hospedeiro, agente etiológico, ou meio ambiente não exercem seus efeitos isoladamente, mas interagem entre si para induzirem a doença (Thrusfield, 2010). Dentre os fatores de risco que facilitam essa interação estão o convívio entre animais domésticos e selvagens, e as mudanças climáticas e no uso do solo, que resultam em desequilíbrio nas relações ecológicas, principalmente, entre reservatórios, vetores e patógenos (Cutler et al., 2010).

A bovinocultura encontra-se constantemente ameaçada pela ocorrência de leptospirose. No entanto, mesmo com medidas profiláticas, a leptospirose ocorre em bovinos nessa região. Por esta razão e pela presença de pequenos mamíferos não voadores, objetivou-se investigar o papel destes pequenos mamíferos, selvagens e

sinantrópicos, na ecologia da leptospirose em uma propriedade rural da região sudeste do estado de Goiás, compreendida em área de Cerrado sob influência atlântica.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Local**

O estudo foi realizado na Fazenda Mata da Fartura, no município de Goiandira, localizada no sudeste do estado de Goiás sob as coordenadas geográficas 18,1630556S; 48,1354722W. Esta é uma propriedade de aproximadamente 68 hectares, caracterizada pela presença de pastagens com muitos fragmentos de matas nativas (formações florestais de Cerrado com influência de Mata Atlântica – área de ecótono) sobre solos rochosos e pouco profundos, e intercomunicantes entre si, e com livre acesso para bovinos.

A propriedade apresenta a bovinocultura de leite como sua principal atividade produtiva, entretanto, entre os meses de maio e agosto recebe bois para confinamento e posterior destino ao corte. Essa realidade caracteriza um maior fluxo de animais naquele ambiente, sem a realização de quarentena. Além das atividades pecuárias comerciais, encontram-se produções extensivas de suínos e aves para subsistência. Esses animais são criados de forma promíscua, em pocilgas e aviários rudimentares, e algumas vezes têm contato com as demais espécies domésticas da propriedade, representadas por cães e equinos para o trabalho.

As fontes de água utilizadas são um poço artesiano e o ribeirão Mata da Fartura, tributário do rio Paranaíba, e que corta a propriedade. Ambas as fontes de água não passam por tratamento. Os animais são dessedentados tanto em cochos, como diretamente no curso d'água. A pocilga apresenta um receptáculo que é abastecido continuamente por um desvio artificial do riacho, e tem o excesso desta água drenado novamente para o

mesmo riacho. Esse *layout* de produção pecuária é muito comum nas propriedades rurais brasileiras.

O clima da região é do tipo Aw de Koopen (Köppen, 1948), caracterizado por uma estação seca de abril a setembro e uma estação úmida de outubro a março, podendo haver variações quanto ao início e término de cada estação climática. Os mapas com a caracterização das áreas de coleta foram elaborados a partir de bancos de dados públicos disponibilizados pelo Google Earth®, e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Utilizou-se as ferramentas dos programas Google Earth® e ArcGis® para a confecção destes mapas.

## **2.2. Questões éticas**

Os procedimentos realizados nos animais deste estudo foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia sob número de protocolo 151/16. Os procedimentos realizados com os pequenos mamíferos não voadores foram também autorizados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), por meio do Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio), sob número de protocolo no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) 52983/1.

## **2.3. Bovinos**

As amostras de sangue foram colhidas por meio de venopunção asséptica da veia coccígea com tubos a vácuo sem anticoagulante, no volume de 10 ml, identificados individualmente e mantidos em temperatura ambiente até a coagulação. Após o repouso e retração do coágulo, fez-se a extração do soro sanguíneo de cada amostra, que foi

devidamente identificada e armazenada a temperatura de -20 °C até o momento das análises.

Foram coletadas amostras de sangue de 66 bovinos, sendo um touro e 46 fêmeas adultas (acima de 48 meses), sete novilhos e 12 novilhas (entre 6 e 24 meses). Todos os bovinos desta propriedade, e acima de 6 meses de idade foram incluídos neste trabalho. Esse rebanho era composto por animais de aptidão leiteira, das raças Gir e mestiças Gir/Holandês sem grau de sangue definido. A coleta nos bovinos foi realizada no final da estação úmida do ano de 2016.

Para se caracterizar o aspecto enzoótico da leptospirose neste rebanho, comparou-se os dados de prevalência deste trabalho com os achados soroepidemiológicos desta mesma propriedade no ano de 2006, em que 87,2% dos animais testados reagiram ao MAT (Moreira et al., 2010).

#### **2.4. Ambientes de captura dos pequenos mamíferos**

As capturas de pequenos mamíferos foram conduzidas em quatro ambientes distintos da propriedade (Figura 1):

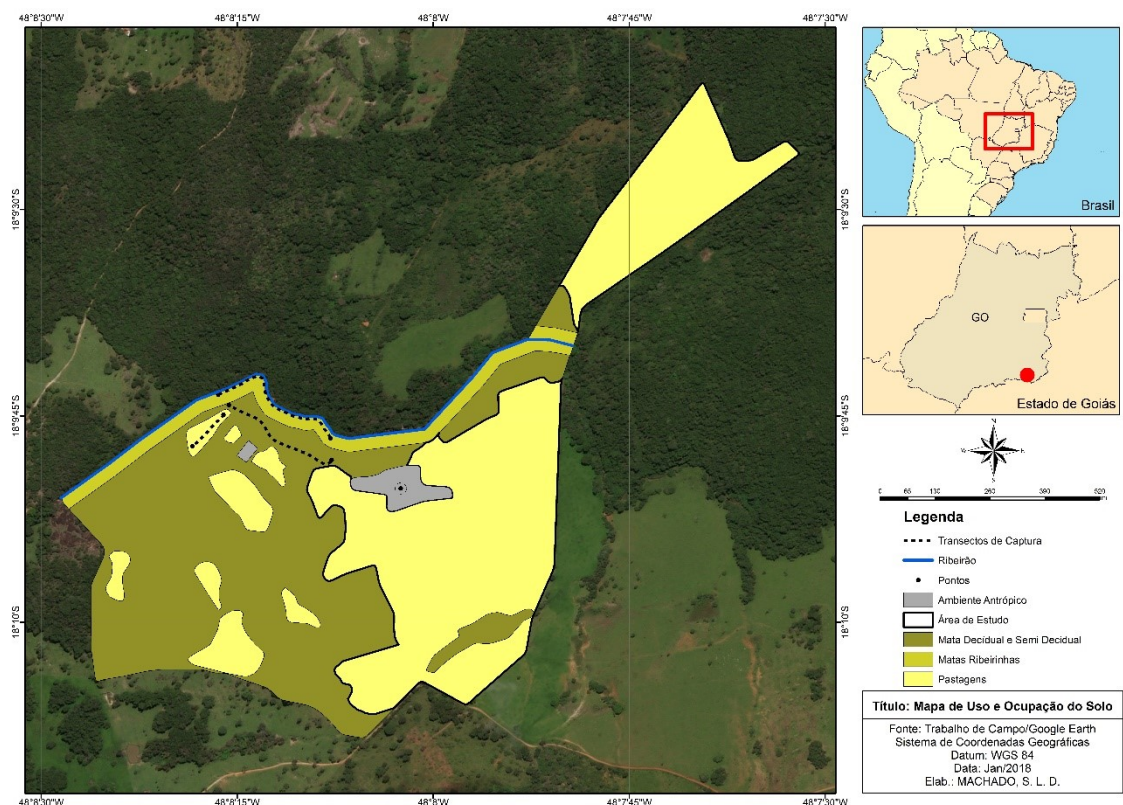
5. Ambiente antrópico: Considerou-se ambiente antrópico os locais próximos a habitações humanas, paióis, casas de máquinas, galpões de armazenamento de insumos.

6. Mata estacional decidual e semidecidual: Considerou-se como mata estacional decidual e semidecidual as formações compostas por estrato arbóreo que durante a estação seca perde toda ou parte das folhas, segundo a classificação de Oliveira-Filho e Ratter (2002).

7. Matas ribeirinhas: Considerou-se como matas ribeirinhas, seguindo a caracterização de Oliveira-Filho e Ratter (2002), aquelas matas estacionais semidecíduais ou decíduais que acompanham a margem do Ribeirão Mata da Fatura.

8. Pasto sujo: Considerou-se pasto sujo a área utilizada para pastoreio do gado, com predomínio do capim *Brachiaria decumbens* em sua altura máxima de crescimento. O pasto amostrado é margeado por alguma das matas já descritas e utilizadas para coleta de pequenos mamíferos.

Figura 1 - Mapa do uso e ocupação do solo e transectos de captura de pequenos mamíferos não voadores. Fazenda Mata da Fartura, Goiandira - Goiás, Brasil, 2016.



## 2.5. Captura dos pequenos mamíferos

Duas campanhas, de quatro noites cada, foram conduzidas para captura de pequenos mamíferos, uma ao final da estação chuvosa (precipitação acumulada de outubro de 2015 a março de 2016: 1260 mm) e outra no final da seca (precipitação acumulada de abril a setembro de 2016: 195 mm) (INPE, 2016).

Foram utilizadas armadilhas dos modelos *Sherman* e *Tomahawk*, iscadas com rodelas de banana cobertas por farelo de paçoca. Para captura no ambiente antrópico

foram utilizadas, em média, oito armadilhas tipo *Sherman* colocadas em variados pontos considerados propícios. Para os ambientes de mata decidual e semidecidual, e de matas ribeirinhas, 50 armadilhas tipo *Sherman* foram montadas em cada uma das duas fisionomias, dispostas em linhas com estações de captura a cada dez metros, sendo uma armadilha armada sobre o solo e outra sobre uma árvore em cada estação. Na área de pasto, oito armadilhas tipo *Tomahawk*, e oito, tipo *Sherman*, foram colocadas linearmente sobre o solo a cada dez metros. Todas as armadilhas foram inspecionadas diariamente pela manhã, com a isca trocada a cada 48 horas ou repostada quando necessário.

Os animais capturados foram contidos farmacologicamente com associação de cloridrato de tiletamina 250mg e cloridrato de zolazepam 250mg na dose de 0,1ml/kg, pela via intramuscular (Silva, 2014) para biometria e sexagem. As fêmeas prenhes e em amamentação foram acondicionadas em sacos de algodão até a recuperação completa, e posteriormente soltas nos seus respectivos locais de captura. Os demais espécimes foram eutanasiados por exsanguinação intracardíaca (CFMV, 2013; CONCEA, 2013).

## **2.6. Coleta de Material Biológico**

### **2.6.1. Pequenos Mamíferos**

Os animais não eutanasiados foram submetidos apenas à punção sanguínea na veia lateral da cauda (Lee e Goosens, 2015). Naqueles eutanasiados, coletou-se sangue pelo método da exsanguinação intracardíaca. As amostras de sangue foram armazenadas em microtubos até a retração do coágulo, e posteriormente fez-se a separação do soro sanguíneo. As amostras de soro foram devidamente identificadas e armazenadas a -20 °C (CFMV, 2013; CONCEA; Silva, 2014).

Também nos espécimes eutanasiados, fez-se uma incisão abdominal para retirada dos rins. Tão logo retirou-se os órgãos, próximo a um bico de Bunsen com chama azul, e

utilizando bisturi estéril, cada rim foi recortado e adicionado em um tubo esterilizado contendo meio de cultura líquido Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris – DifcoR (EMJH), enriquecido em 15% com soro sanguíneo de coelho (inativado a 60°C por 30 minutos), e adicionado de 5-fluorouracil a 300 mg/L, e ácido nalidixico na concentração de 20mg/L. Posteriormente cada amostra foi identificada e incubada à temperatura de 28°C por 48 horas, para depois ser congelada a -80°C (Ellis et al., 1982; Magajevski et al., 2005; Thiermann, 1980).

#### 2.6.2. Sorologia

As amostras de soro sanguíneo de bovinos e pequenos mamíferos foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, para a detecção de anticorpos contra 25 sorovares de *Leptospira* spp, sendo 21 sorovares de cepas padrão (Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Castelonis, Copenhageni, Cynopteri, Djasiman, Guaricura, Grippotyphosa, Hardjobovis, Hardjoprajitno, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Sejroe, Shermani, Tarassovi e Wolffi), e quatro sorovares de estirpes de isolados de pequenos mamíferos sinantrópicos e selvagens no Brasil (Brasiliensis, Pomona e 2 cepas diferentes de Copenhageni) (Quadro 1).

Tais coleções de cepas padrão e de estirpes de isolados brasileiros foram gentilmente doadas pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal Fluminense.

O diagnóstico sorológico foi feito pelo método de Soroaglutinação Microscópica (MAT), padronizando-se reagente maior ou igual a 50% de aglutinação de antígenos por campo a uma diluição final de 1:100 do soro sanguíneo, tanto em bovinos como em



roedores e marsupiais (Faine et al., 1999; Faria et al., 2008; Jorge et al., 2012; dos Santos Paixão et al., 2014; Majetic et al., 2014; Silva, 2014).

### 2.6.3. PCR

Os fragmentos renais foram enviados ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense para realização de extração de DNA e ensaio da PCR para detecção do gene *lipL32*, comum a estirpes patogênicas de leptospiras. A extração de DNA de tecido foi realizada com Kit DNeasy® blood & Tissue Kit (Qiagen) conforme instruções do fabricante. Uma etapa prévia de lavagem e digestão do tecido foi realizada: duas lavagens com 2 ml de tampão PBS 1 vez por duas horas cada e com 20µl de Proteinase K 20 mg/ml (Invitrogen®) à 56°C até completa digestão.

No ensaio da PCR para a detecção do gene *lipL32* foram empregados os *primers* *lipL32*-45F (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') e *lipL32*-286R (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3'), projetados por Stoddard et al. (2009), na qual amplifica-se um fragmento de 243pb. A reação foi realizada com volume final de 25µl contendo: 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 7,5 pmol de cada *primer*; 1 vez GoTaqReaction Buffer; 250µM de cada desoxinucleotideo trifosfatado (dNTP), 0,5 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 6 µl de DNA. Seguindo o programa de temperaturas: desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e extensão final de 72°C por 5 minutos. Foi utilizado a estirpe padrão *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe FIOCRUZ L1-130 como controle positivo para as reações de PCR. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 2% com tampão 0,5 X TBE (Tris – ácido bórico – EDTA). O DNA presente nos produtos de PCR foi corado com uma solução 20X Gel Red® (Biotium) e visualizados sob luz ultravioleta.

1098           **2.7. Análise Estatística**

1099           A análise estatística foi realizada por meio do teste de associação não-paramétrico  
1100 de qui-quadrado, para verificar a significância da associação dos fatores estudados. O  
1101 software estatístico R Core Team (2016) foi utilizado para realização dos testes.

102 Quadro 1. Antígenos empregados na técnica de soroaglutinação microscópica (MAT), segundo a cepa, espécie, sorogrupo, sorovar, hospedeiro, instituição de  
 103 origem e ano do isolamento.

Cepas Padrão						
Cepa	Espécie	Sorogrupo	Sorovar	Hospedeiro	Instituição de Origem	Ano
Sponselee	<i>L. borgpeterseni</i>	Sejroe	Hardjobovis	-	Instituto Pasteur	-
Moskva V	<i>L. kirschneri</i>	Grippytyphosa	Grippytyphosa	-	Instituto Pasteur	-
Hond Utrecht IV	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	-	Instituto Pasteur	-
Ballico	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	-	Instituto Pasteur	-
Akiyami	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	-	Instituto Pasteur	-
Verdun	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	-	Instituto Pasteur	-
M84	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	-	Instituto Pasteur	-
Djasiman	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	-	Instituto Pasteur	-
Van Tienen	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	-	Instituto Pasteur	-
Castellon 3	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	-	Instituto Pasteur	-
CZ 214k	<i>L. noguchi</i>	Panama	Panama	-	Instituto Pasteur	-
Jez Bratislava	<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	-	FIOCRUZ	-
1342K	<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	-	Instituto Pasteur	-
M20	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	-	FIOCRUZ	-
Poi	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	-	Instituto Pasteur	-
Perepelitsin	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	-	Instituto Pasteur	-
3705	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	-	Instituto Pasteur	-
3522C	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	-	Instituto Pasteur	-
BOV G	<i>L. santarosai</i>	Sejroe	Guaricura	-	FIOCRUZ	-
Hardjoprajitno	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjoprajitno	-	OMS	-
Hebdomadis	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	-	Instituto Pasteur	-
Estirpes de Isolados no Brasil (pequenos mamíferos não voadores)						
AN776	<i>L. sanarosai</i>	Bataviae	Brasiliensis	Gambá	Instituto Biológico de São Paulo	1961
M10/99	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	<i>Rattus norvegicus</i>	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	1999
Rato	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	<i>Rattus norvegicus</i>	Instituto Biológico de São Paulo	1999
M36/05	<i>L. kirschneri</i>	Pomona	Não caracterizado	<i>Rattus</i> sp	VPS/FMVZ/USP	2005

### 3. Resultados

#### 3.1. Bovinos

Dos 66 bovinos, 60 (90,91%) foram reagentes ao MAT para pelo menos um sorovar de leptospirose (Tabela 1), o que sugere comportamento enzoótico neste rebanho, dada a manutenção da prevalência em taxas semelhantes (87,2%) desde o ano de 2006 (Moreira et al., 2010). É importante ressaltar que nenhuma medida de controle para leptospirose foi adotada após o diagnóstico de 2006. O manejo sanitário, alimentar e de dessedentação, bem como os insumos e instalações utilizados, não foram modificados. Houve diferenças estatísticas significantes somente entre a faixa etária ( $p = 0,0087$ ), em que animais acima de 24 meses se apresentavam com maior frequência de aglutininas anti-leptospiras patogênicas, se comparados aos animais abaixo de 24 meses de idade.

Tabela 1 - Frequência de bovinos reagentes ao MAT para leptospirose e suas respectivas categorias etária e sexual, Goiandira – GO, 2016.

Categoria	Número de amostras	Animais reagentes ao MAT	Reagentes ao MAT (%)
Fêmea	58	53	91,37
Macho	8	7	87,5
Idade 6 – 24 meses	19	14 <sup>b</sup>	73,68 <sup>b</sup>
Idade > 24 meses	47	46 <sup>a</sup>	97,87 <sup>a</sup>
Total	66	60	90,91

Letras diferentes entre linhas indicam diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ )

Em ordem decrescente de frequência, encontrou-se reagentes para os seguintes sorovares (Tabela 2): Icterohaemorrhagiae e Pomona cepa M36/05 ( $n=31/51,66\%$ ); Copenhageni cepa M10/99 ( $n=29/48,33\%$ ); Tarassovi ( $n=27/45\%$ ); Copenhageni cepa

1124 Rato (n=17/28,33%); Shermani (n=14/23,33%); Guaricura e Hardjoprajitno  
 1125 (n=11/18,33%); Australis, Bratislava e Djasiman (n=4/6,67%); Hebdomadis,  
 1126 Copenhageni cepa padrão e Wolffi (n=3/5%); Bataviae e Javanica (n=2/3,33%);  
 1127 Autumnalis, Brasiliensis, Canicola e Grippotyphosa (n=1/1,66%).

1128 Dentre os animais reagentes ao MAT para leptospirose, verificou-se maiores  
 1129 títulos de anticorpos contra os sorovares Copenhageni (M10/99), Guaricura, Tarassovi e  
 1130 Icterohaemorrhagiae, que alcançaram a diluição de 800. Seguidos dos sorovares Pomona  
 1131 e Wolffi que aglutinaram no maior título de 400; e Australis, Copenhageni (cepa padrão),  
 1132 Copenhageni (cepa Rato), Hardjoprajitno e Hebdomadis que obtiveram maior título a  
 1133 diluição 200 (Tabela 3).

1134 Dentre todas as reações de aglutinação para os 25 sorovares testados, que foram  
 1135 num total de 200, pôde-se verificar que em 40% delas (80 reações), as amostras de soro  
 1136 sanguíneo dos bovinos deste estudo reagiram contra sorovares pertencentes ao sorogrupo  
 1137 Icterohaemorrhagiae, seguidos pelos sorogrupos Pomona (15,5%), Tarassovi (13,5%),  
 1138 Sejroe (12,5%), Shermani (7%), Australis (4%), Djasiman (2%), Bataviae e Hebdomadis  
 1139 (1,5%), Javanica (1%), e Autumnalis e Canicola (0,5%). E os maiores títulos de  
 1140 anticorpos foram encontrados reagentes para os sorogrupos Icterohaemorrhagiae, Sejroe  
 1141 e Tarassovi na diluição de 1/800.

1142 Tentou-se o isolamento de leptospiras a partir da urina de bovinos, bem como da  
 1143 urina e tecido renal de pequenos mamíferos (Magajevski et al., 2005, Silva, 2014), porém  
 1144 não houve sucesso.

1145 A maior parte das coaglutinações ocorreu entre os sorogrupos  
 1146 Icterohaemorrhagiae e Tarassovi, em que 36,66% dos bovinos reagentes ao MAT eram  
 1147 positivos a pelo menos um sorovar de cada um desses sorogrupos. O mesmo foi  
 1148 encontrado para os sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Pomona, em 35% dos animais

1149 reagentes ao MAT; e para os Sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Sejroe, com 25% dos  
1150 animais testados e reagentes ao MAT.

1151

1152 Tabela 2 - Frequência de títulos de anticorpos (200; 400 e 800) por sorovares dentre os  
1153 animais reagentes ao MAT (técnica da aglutinação microscópica) para *Leptospira* spp.  
1154 em rebanho bovino, Goiandira – GO, 2016.

Sorovares	Frequência de Títulos (n/%)		
	200	400	800
Australis	01 (1,66)	--	--
Copenhageni (padrão)	01 (1,66)	--	--
Copenhageni (M10/99)	08 (13,33)	02 (3,33)	01 (1,66)
Copenhageni (Rato)	03 (5)	--	--
Guaricura	01 (1,66)	--	01 (1,66)
Hardjoprajitino	02 (3,33)	--	--
Hebdomadis	01 (1,66)	--	--
Icterohaemorrhagiae	06 (10)	03 (5)	05 (8,33)
Pomona (M36/05)	--	01 (1,66)	--
Tarassovi	08 (13,33)	03 (5)	01 (1,66)
Wolfii	--	01 (1,66)	--

1155

### 1156 3.2. Pequenos Mamíferos

1157 Foram capturados 28 espécimes de pequenos mamíferos não voadores (Tabela 3)  
1158 durante as duas campanhas (úmida e seca de 2016), pertencentes a apenas uma espécie  
1159 de marsupial (*Gracilinanus agilis*, n = 14) e seis espécies de roedores (*Calomys* sp., n =  
1160 2; *Hylaeamys megacephalus*, n = 4; *Nectomys squamipes*, n = 1; *Oecomis bicolor*, n = 2;  
1161 *Rattus rattus*, n = 3). Destes, três fêmeas (*Gracilinanus agilis*, n = 1; *Oecomis bicolor*, n

= 1; *Hylaeamys megacephalus*, n = 1) foram liberadas após recuperação da contenção farmacológica por estarem prenhes ou em amamentação.

Nenhum dos espécimes de roedores e marsupiais capturados foram reagentes ao MAT. Para os resultados da PCR para o gene *lipL32*, 15 (53,57%) dos 28 espécimes de pequenos mamíferos foram positivos. Destes, nove (64,29%) espécimes de *Gracilinanus agilis* e seis (42,86%) espécimes de roedores (*Calomys* sp., n = 2; *Hylaeamys megacephalus*, n = 2; *Oecomys bicolor*, n = 1; *Nectomys squamipes*, n = 1) tiveram amplificado o gene *lipL32* a partir de suas amostras renais (Tabela 4). A taxa de captura e de espécimes positivas à PCR foi maior ao final da estação seca, em que dos 23 pequenos mamíferos capturados (13 marsupiais e dez roedores), 14 (nove marsupiais e cinco roedores) estavam positivos. Em contrapartida, ao final da estação chuvosa foram capturados apenas cinco exemplares, sendo quatro roedores e um marsupial, e destes, apenas um roedor, *Hylaeamys megacephalus*, foi positivo à PCR.

Ao se considerar o total de espécimes de pequenos mamíferos capturados por ambiente, tem-se em ordem decrescente mata estacional decidual e semidecidual (13 animais, nove positivos na PCR), matas ribeirinhas (nove animais, quatro positivos na PCR), pasto sujo (três animais, sendo dois positivos na PCR) e ambiente antrópico (três animais, e nenhum positivo na PCR).

Quando se considera o local de instalação das armadilhas, solo ou árvore, a abundância foi numericamente maior no solo, alcançando 17 espécimes capturados. Já em armadilhas instaladas em árvores, capturou-se apenas 11 espécimes. E a ocorrência do gene *lipL32* foi encontrado em dez dos pequenos mamíferos capturados no solo (58,82%), e cinco dos espécimes recolhidos em armadilhas de árvore (45,45%).

Não houve diferença estatística para frequências de reação positiva à PCR entre quaisquer dados de ordem (Marsupialia e Rodentia), ambiente de captura, local de

1187 instalação de armadilha e mês de captura. Os dados referentes a essas características  
1188 frente aos resultados de PCR estão descritos na Tabela 3 e representados na Figura 2.  
1189



1190 Tabela 3 - Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR de tecido renal para o gene *lipL32* de leptospiros patogênicos em seus  
 1191 respectivos ambientes de captura, local de instalação de armadilhas e mês de captura. Fazenda Mata da Fartura, Goiandira – GO, 2016.

Total de espécimes capturados			Ambiente de captura								Local de instalação das armadilhas				Estação do ano			
			Antrópico		Pasto sujo		Mata estacional decidual e semidecidual		Matas Ribeirinhas		Solo		Árvore		Úmida		Seca	
			N	PCR (n/%)	N	PCR (n/%)	N	PCR (n/%)	N	PCR (n/%)	N	PCR (n/%)	N	PCR (n/%)	N	PCR (n/%)	N	PCR (n/%)
Marsupiais	14	09(64,29)	0	0	0	0	11	8(72,72)	3	1(33,33)	6	5(83,33)	8	4(50)	1	0	13	9(69,23)
Roedores	14	06(42,86)	3	0	3	2(66,66)	2	1(50)	6	3(50)	11	5(45,45)	3	1(33,33)	4	1(25)	10	5(50)
Total	28	15(53,57)	3	0	3	2(66,66)	13	9(69,23)	9	4(44,44)	17	10(58,82)	11	5(45,45)	5	1(20)	23	14(60,87)

1192

1193

1194

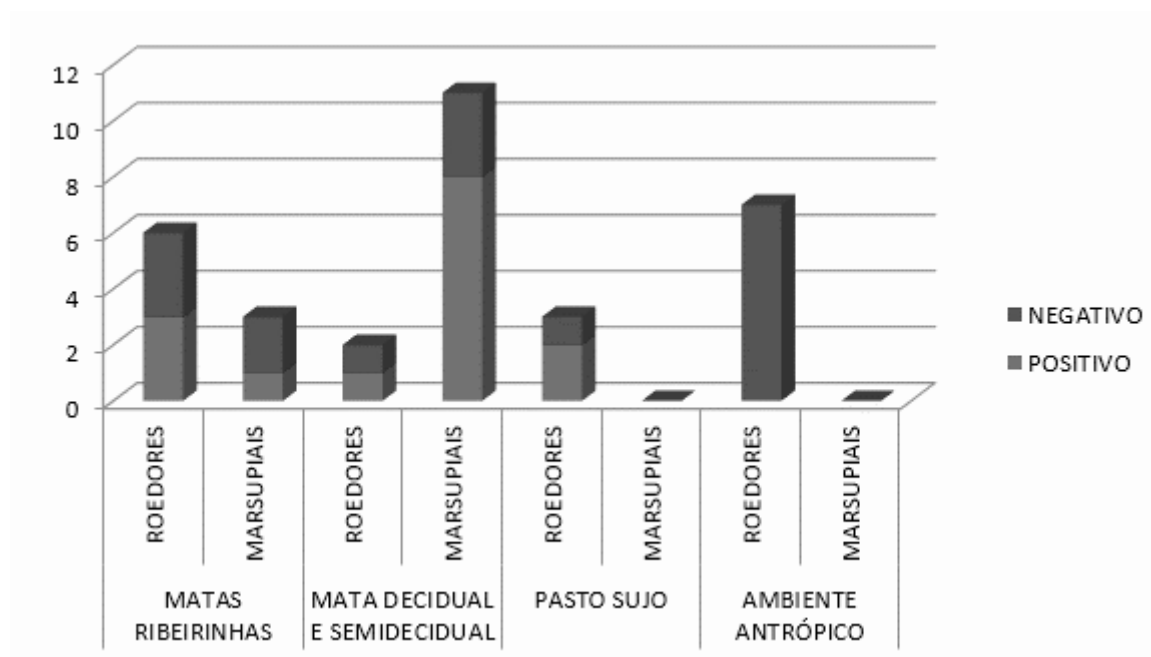
1195

1196

1197

1198

1199 Figura 2 - Distribuição de pequenos mamíferos capturados e positivos à PCR para o gene *lipL32* em seus respectivos ambientes de captura. Fazenda  
 1200 Mata da Fartura, Goiandira – GO, 2016.



1201

#### 4. Discussão

Mesmo os pequenos mamíferos capturados não terem apresentado aglutininas contra qualquer sorovar de *Leptospira* spp., os resultados da PCR positiva em 15 amostras de rim, dos 28 animais capturados (53,57%), indicam uma alta taxa de portadores renais de leptospiros patogênicas (Vieira et al., 2016). Esta maior taxa pode ser justificada também por uma maior sensibilidade da PCR em tecido renal, em detrimento do uso de urina para identificação do gene *lipL32*, dada a eliminação intermitente de leptospiros por essa via de excreção (Fornazari et al., 2018), visto que a PCR é considerada uma adequada técnica epidemiológica para detecção de reservatórios (Faria et al., 2008). Assim, os pequenos mamíferos se configuram como agentes de destaque na epidemiologia da leptospirose na área estudada.

Sabe-se que os roedores e marsupiais são importantes reservatórios de leptospiros patogênicas, pois se mantêm infectados por um longo período sem manifestar a doença. Entretanto considera-se a ordem Rodentia como a principal delas na manutenção deste patógeno no ambiente, inclusive entre os animais selvagens (Adler e de la Peña Moctezuma, 2010; Andersen-Ranberg et al., 2016; Cheema et al., 2007; Costa et al., 2014; Da Silva et al., 2010; Faria et al., 2008; Nakamura et al., 2013; Reilly, 1970).

Os hospedeiros reservatórios naturais podem apresentar níveis indetectáveis de anticorpos, com concentrações no soro sanguíneo menores que o amplamente aceito, na diluição 1/100 (Ellis, 2015; Muthukkaruppan et al., 2007; Sunbul et al., 2001; Vinetz et al., 1996), devido a adaptação destes animais à infecção de *Leptospira* spp. no decorrer da evolução de suas espécies (Stritof Majetic et al., 2014). Essa condição pode ter refletido nos resultados de MAT deste estudo, em que nenhum dos pequenos mamíferos coletados apresentaram aglutininas anti-leptospiros.

Geralmente as estirpes de referência usadas para o diagnóstico pelo MAT não contemplam os sorogrupos responsáveis pela infecção dos animais, domésticos e selvagens, em determinadas áreas. Desta forma a sensibilidade do teste é comprometida, e se vê necessário isolar as estirpes circulantes naquele ambiente, a fim de aumentar, até dez vezes, esta sensibilidade do método diagnóstico (Jorge et al., 2012; Mgode et al., 2015).

A PCR, no entanto, é uma técnica que corrige parte dessas desvantagens associadas ao MAT, por ser capaz de distinguir os animais portadores renais de leptospiros patogênicos a partir da identificação do gene *lipL32* em tecidos e excreções dos portadores. A PCR tem boa sensibilidade tanto em hospedeiros reservatórios, quanto naqueles portadores de estirpes não conhecidas. Entretanto, a PCR não identifica o sorovar infectante, o que impossibilita um estudo epidemiológico mais preciso, visto que só se pode distinguir as infecções incidentais e não incidentais ao se conhecer qual o sorovar ou sorogrupo de ocorrência, possibilitando a identificação das fontes de infecção a partir da associação de cada sorovar/sorogrupo com suas espécies de hospedeiros mantenedores/reservatórios (Dos Santos Paixão et al., 2014; Faria et al., 2008; Jorge et al., 2012; Mgode et al., 2015; Vieira et al., 2016).

Existia uma forte hipótese, dada a importância dos roedores sinantrópicos como reservatório de leptospiros, dos espécimes capturados no ambiente antrópico serem positivos na PCR (Adler e de la Peña Moctezuma, 2010; Silva, 2014). Entretanto, os três únicos roedores capturados neste ambiente, pertencentes à espécie *Rattus rattus*, não estavam reagentes ao MAT nem à PCR. Isso pode ter-se dado pelo número reduzido de indivíduos capturados dessa espécie, ou pelo fato do ambiente de vida desses animais não sobrepor ao ambiente de vida das outras espécies estudadas.

Já no ambiente de pasto sujo, que margeava a borda da mata, e que representava um importante local de interface entre a área de vida das espécies de pequenos mamíferos selvagens e dos bovinos, dos três roedores capturados (*Calomys* sp.), dois apresentaram o gene *lipL32* extraído de tecidos renais. Sendo assim esses animais se configuram como importantes agentes eliminadores de leptospiros nesse ambiente, incrementando o risco de infecção tanto de bovinos, quanto das demais espécies selvagens ali coabitantes.

Dentre as espécies de pequenos mamíferos não voadores capturados, apenas uma pertencia à ordem Marsupialia, o *Gracilinanus agilis*. Trata-se de um didelfídeo de pequeno porte (20-45 g), que foi numericamente mais prevalente como portador renal (64,29%), quando comparado aos roedores (42,86%). Os *Gracilinanus agilis* são animais arborícolas (Emmons e Feer, 1997), desta forma foram capturados somente nos ambientes com formação florestal (mata estacional decidual e semidecidual, e matas ribeirinhas) com destaque para a mata estacional decidual e semidecidual, em que dos 11 animais amostrados, oito (72,72%) foram positivos à PCR. Quando avaliado a proporção de portadores renais entre os *Gracilinanus agilis* capturados na campanha do final da estação seca, 69,23% dos animais estavam positivos à PCR.

Visto que o risco de infecção depende da ecologia das espécies de hospedeiro, como área de vida, comportamento de forrageamento e contato com outros animais (Fornazari et al., 2018), identifica-se o papel de *Gracilinanus agilis* como espécie selvagem importante na manutenção e circulação de leptospiros patogênicos em ambientes de mata. Esta espécie apresenta uma dieta mais seletiva (insetívora), por isso precisam ampliar sua área de forrageamento durante o período seco do ano (escassez de alimentos), aumentando assim o contato com solo, e com diferentes ambientes. Desta forma são mais desafiados pelas leptospiros eliminadas por outras espécies animais (selvagens ou domésticas), com *status* de portadoras renais, em sua área de vida (Bagagli

et al., 1998; Drancourt et al., 2006; Ko et al., 1999; Martins et al., 2006; Ramos, 2007; Pinheiro et al., 2002; Sarkar et al., 2002).

Nos ambientes de captura florestados e de pasto sujo, notou-se uma ocorrência de pequenos mamíferos portadores renais de leptospiros patogênicas, com ocorrência entre os animais de mata estacional decidual e semidecidual (69,23% dos animais), seguida pelo pasto sujo (66,66%) e matas ribeirinhas (44,44%). Isso confirma o fluxo de leptospiros patogênicas entre os diferentes ambientes coletados, demonstrando a importância dos pequenos mamíferos selvagens na manutenção e veiculação deste patógeno na propriedade estudada, e reforçada pelos resultados do estudo de sorovares circulantes no ambiente a partir dos bovinos.

Devido à baixa sensibilidade do MAT para identificação de reservatórios naturais de leptospiros, como os roedores e os marsupiais (Ellis, 2015; Jorge et al., 2012; Muthukkaruppan et al., 2007; Sunbul et al., 2001; Vinetz et al., 1996), buscou-se detectar os sorovares e sorogrupos de leptospiros patogênicas circulantes no ambiente de estudo por meio dos bovinos que ali eram mantidos. Pôde-se verificar uma maior frequência de bovinos sororreagentes a estirpes isoladas a partir de *Rattus* sp. e *Rattus norvegicus* (estirpes M10/99, Rato e M36/05), bem como para a cepa padrão dos sorovar *Icterohaemorrhagiae*, também mantida por pequenos mamíferos (Dos Santos Paixão et al., 2014; Faria et al., 2008; Yalin et al., 2011). Notou-se também uma considerável frequência de bovinos reagentes ao sorovar Tarassovi, comumente associado aos suínos no Brasil, tanto pelo diagnóstico sorológico quanto pelo isolamento (Sobestiansky et al., 1999).

É sabido que animais no mesmo ambiente se infectam mutuamente com seus sorovares (Esteves et al., 2005; Magajevski et al., 2005), e este fato permite inferir que os bovinos estão sendo desafiados por sorovares mantidos no ambiente tanto pelos pequenos

mamíferos quanto pelos suínos (Mgode et al., 2015), apesar de não se ter coletado, neste trabalho, material biológico dos suínos para o diagnóstico de leptospirose. Tal fato pode ser reforçado ao se comparar os resultados de sorovares mais prevalentes nesta propriedade em um estudo anterior, realizado por Moreira et al. (2010), em que 87% do rebanho estava reagente ao MAT, em um padrão divergente para os sorovares. Em 2010 encontraram-se principalmente bovinos reagentes aos sorovares Wolffi (21%), Hardjo (20%), Brastislava (14,5%), Australis (13,7%) e Tarassovi (9,8%).

Alguns fatores de risco estão comprovadamente associados à leptospirose bovina, entre elas estão a criação conjunta ou promíscua de bovinos e suínos, o contato de roedores com alimentos dos bovinos (paiol, cochos, etc.), a presença de roedores e/ou animais selvagens no mesmo ambiente, e a dessedentação a partir de água de rio e cacimbas, que pode aumentar em 4,43 vezes a chance de infecção em comparação a uma fonte de água clorada (Agampodi et al., 2014; Draghi et al., 2011; Fávero et al., 2017; Lilenbaum e Souza, 2003; Mclean et al., 2014; Petrakovsky et al., 2014; Schoonman e Swai, 2010).

Outro fator de risco de fundamental importância para infecção de bovinos neste trabalho, foi a idade. Em que a frequência de bovinos com idade superior a 24 meses e sororreagentes ao MAT (97,87%) foi significativamente maior que frequência encontrada nos bovinos abaixo de 24 meses de idade (73,68). Esse fator pode estar associado à maturidade sexual do rebanho, sendo maior a chance de ocorrência da infecção em bovinos no início da atividade reprodutiva, bem como o maior tempo de exposição ao ambiente contaminado, e às próprias fontes de infecção da doença (Cortese, 2009; Guimarães, 2017). Entretanto, pode-se observar que mesmo com essas condições de anteparo aos animais mais jovens contra a leptospirose, a frequência de sororreagentes

entre os bovinos abaixo dos 24 meses de idade ainda foi bastante alta, indicando um alto grau de desafio a que todo rebanho estava sendo submetido.

Em pesquisa sobre a manutenção de leptospiros no ambiente, Thibeaux et al. (2017) identificaram o solo como um reservatório ambiental de leptospiros patogênicos, mantendo-as viáveis por até quatro meses, em sua própria atmosfera protetora. Principalmente em solos superficiais, em profundidades de 1 a 5 cm, e em faixas de 1 m de distância do limite da lâmina d'água de rios e riachos. Bovinos, suínos e pequenos mamíferos desta pesquisa tinham acesso à água do ribeirão da propriedade estudada, logicamente com o solo adjacente. Desta forma acredita-se que este ambiente seja uma interface essencial para a circulação de leptospiros patogênicos entre todas as espécies domésticas e selvagens ali encontradas.

É importante ressaltar que o ribeirão era a principal fonte de água para dessedentação e equilíbrio térmico dos suínos, e que o excedente da água utilizada por esses animais retornava ao curso d'água. Os bovinos também utilizam da água do ribeirão para hidratação, sendo assim, verifica-se um contato destes animais com água contaminada pela urina daqueles.

*Nectomys squamipes* são ratos semiaquáticos, conhecidos como rato-d'água, e pela característica de seu ambiente de vida, os mesmos se tornam mais susceptíveis ao contato com água contaminada por urina de outros animais portadores renais, aumentando o risco de infecção. Também constituem uma importante interface entre os ambientes aquático e terrestre, promovendo a circulação de leptospiros patogênicos entre os dois ecossistemas (Bonvicino et al., 2008; Cordeiro et al., 1981; Emmons e Feer, 1997; Fávero et al., 2017; Ko et al., 1999; Martins et al., 2006; Pinheiro et al., 2002; Ramos, 2007; Sarkar et al., 2002)



Dentre os oito bovinos que apresentaram maior titulação (800), seis mostraram maior concentração de aglutininas para sorovares do sorogrupo Icterohaemorrhagiae (cinco Icterohaemorrhagiae e um Copenhageni M10/99), um bovino para o sorogrupo Sejroe (sorovar Guaricura), e um para o sorogrupo Tarassovi (sorovar Tarassovi). O sorogrupo Icterohaemorrhagiae está intimamente associado a seus reservatórios roedores e gambás, tanto no meio urbano como no meio rural (Duhamel et al., 1998; Esteves et al., 2005; Ko et al., 1999; Langoni et al., 2008; Lilenbaum et al., 1993; Pereira et al., 2005; Silva, 1976). Esse é um sorogrupo que provoca infecção incidental em bovinos, ou seja, para haver a infecção nesses ruminantes, necessita-se de um ambiente contaminado pela urina de seus reservatórios. Sendo assim, no ambiente estudado, reforça-se o papel dos pequenos mamíferos na manutenção e veiculação de leptospiras patogênicas.

O sorogrupo Sejroe está adaptado aos bovinos, e a transmissão se dá principalmente pelo contato direto entre indivíduos dessa mesma espécie (Ellis, 2015). Entretanto, mesmo com medidas clássicas de controle e profilaxia, bovinos adoecem com leptospirose. A identificação de baixos índices reprodutivos, muita das vezes leva ao diagnóstico presuntivo, sendo confirmado por uma alta soroprevalência (MAT) para sorovares não frequentes na espécie bovina (Moreira et al., 2010). No presente estudo, a frequência de animais sororreagentes para sorovares do sorogrupo Sejroe foi numericamente menor que para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae. Adicionalmente, sabendo que a frequência de animais com títulos de 800 para o sorogrupo Tarassovi, associados a suínos (Sobestiansky et al., 1999) foi igual para o sorogrupo Sejroe. Desta forma reitera-se que os pequenos mamíferos são agentes de destaque na epidemiologia da leptospirose na área estudada.

Na área pesquisada verifica-se a composição de um mosaico entre áreas de pastagens e matas (deciduais, semi deciduais e ribeirinhas) a que os bovinos tinham livre

acesso (Figura 1). É sabido que a presença do gado dentro de fragmentos florestais amplifica os efeitos de borda, produzindo um fenômeno que altera a estrutura da vegetação, compacta o solo, favorece a proliferação de espécies selvagens oportunistas e generalistas, resultando por sua vez na proliferação e dispersão de patógenos mantidos por essas espécies favorecidas no ambiente (Daszak et al., 2004; Primack e Rodrigues, 2001; Rivero, 2016).

Esta realidade somente foi possível pela ação antrópica, que ao alterar o ambiente promove o desequilíbrio da tríade epidemiológica, induzindo a ocorrência de leptospirose. Os seres humanos são hospedeiros acidentais, não adaptados a qualquer sorovar, e por isso apresentam vigorosa suscetibilidade à infecção por *Leptospira* spp. (Faine et al., 1999; Ko et al., 2009). Existem evidências que sorogrupos mantidos por roedores selvagens são correlatos aos de prevalência sorológica na leptospirose humana (Mgode et al., 2015; Silva, 2014; Stritof Majetic et al., 2014).

Ao se criar ambientes em desequilíbrio ecológico, e ao se identificar diferentes espécies de mamíferos portadores renais de um mesmo sorovar, o favorecimento da infecção em humanos é constatado (Mgode et al., 2015). Dessa forma, sabendo-se que 53,57% dos pequenos mamíferos eram portadores renais de leptospirosas patogênicas, e que 65,15% dos bovinos deste estudo estavam reagentes ao MAT para pelo menos uma das estirpes do sorovar Copenhageni, ou mesmo para o sorovar Icterohaemorrhagiae, intensamente patogênicos para humanos, identificou-se um notável risco ocupacional para leptospirose na propriedade estudada.

Dentre as sete espécies de pequenos mamíferos não voadores que foram capturadas, todas as espécies selvagens foram identificadas como portadoras renais de leptospirosas patogênicas. Isso demonstra a ampla variedade de hospedeiros para *Leptospira* spp., e que este patógeno está bem adaptado a uma série de diferentes espécies

de pequenos mamíferos selvagens em ambiente de ecótono Cerrado-Mata Atlântica (Obiegala et al., 2016). Espécies domésticas, como suínos e bovinos, também são considerados importantes reservatórios de leptospiros patogênicas, principalmente associados aos riscos de infecção humana. A exposição a criações peridomésticas de bovinos e suínos com altas prevalências para leptospirose (caso do rebanho bovino deste estudo) representa um dos principais fatores de risco para leptospirose humana (Barragan et al., 2016).

Além do risco ocupacional da leptospirose (para magarefes, médicos veterinários, tratadores, proprietários rurais, técnicos de irrigação, etc.), outro importante fator de risco associado aos casos de leptospirose humana é o risco recreacional, pelo contato humano com água e ambientes contaminados durante atividades desportivas e de lazer junto a matas e cursos d'água (Guernier et al., 2017; Mgode et al., 2015; Obiegala et al., 2016; Thibeaux et al., 2017). Visto que a água e o solo são importantes ambientes de manutenção de leptospiros patogênicos (Ellis, 2015; Thibeaux et al., 2017).

Em casos de patógenos que infectam mais de uma espécie hospedeira, a população da espécie hospedeira mais resistente será favorecida, em detrimento daquelas espécies em que o patógeno é mais virulento (Hudson, Dobson, Lafferty, 2006), logo, espera-se que a população de pequenos mamíferos não voadores seja favorecida em ambientes com *Leptospira* circulante. O que fortalece a hipótese de que os pequenos mamíferos não voadores, marsupiais e roedores, desempenhem relevante papel na ecologia da leptospirose na propriedade estudada.

A transmissão de *Leptospira* também é favorecida em casos de alta densidade de hospedeiros, e em geral, qualquer introdução de novas espécies hospedeiras aumenta a transmissão deste patógeno, devido a intensificação do contato entre os indivíduos dentro do mesmo ambiente (McCallum, Barlow, Hone, 2001), o que ocorreu na propriedade

1423 estudada, quando se possibilitou a sobreposição dos ambientes de vida de bovinos e  
1424 pequenos mamíferos selvagens.

1425       Sendo assim, acredita-se que a ação antrópica alterando o ambiente seja  
1426 responsável pelas altas frequências de bovinos reagentes ao MAT, e de pequenos  
1427 mamíferos selvagens como portadores renais de leptospiros patogênicos. Pequenos  
1428 mamíferos não voadores se confirmaram como importantes vias de manutenção e  
1429 circulação de leptospiros patogênicos no ambiente estudado.

1430

1431

1432

1433

1434

1435

1436

1437

1438

1439

1440

1441

1442

1443

1444

1445

1446

1447

## Referências Bibliográficas

- Adler, B., de la Peña Moctezuma, A., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. Vet. Microbiol. 140, 287–296. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012
- Agampodi, S.B., Karunarathna, D., Jayathilala, N., Rathnayaka, H., Agampodi, T.C., Karunanayaka, L., 2014. Outbreak of leptospirosis after white-water rafting: Sign of a shift from rural to recreational leptospirosis in Sri Lanka? Epidemiol. Infect. 142, 843–846. doi:10.1017/S0950268813001465
- Agência Nacional de Águas, 2013. Plano de Recursos Hídricos e do Enquadramento dos Corpos Hídricos Superficiais da Bacia Hidrográfica do Rio Paranaíba.
- Akande, O.A., 2011. A study on wild rat behaviour and control on a pig farm. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Andersen-Ranberg, E.U., Pipper, C., Jensen, P.M., 2016. Global Patterns of *Leptospira* Prevalence in Vertebrate Reservoir Hosts. J. Wildl. Dis. 52, 468–477. doi:10.7589/2014-10-245
- Backhans, A., Jacobson, M., Hansson, I., Lebbad, M., Lambertz, S.T., Gammelgård, E., Saager, M., Akande, O., Fellström, C., 2013. Occurrence of pathogens in wild rodents caught on Swedish pig and chicken farms. Epidemiol. Infect. 141, 1885–1891. doi:10.1017/S0950268812002609
- Bagagli, E., Sano, A., Coelho, K.I., Alquati, S., Miyaji, M., De Camargo, Z.P., Gomes, G.M., Franco, M., Montenegro, M.R., 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58, 505–512. doi:10.4269/ajtmh.1998.58.505
- Barragan, V., Chiriboga, J., Miller, E., Olivas, S., Birdsell, D., Hepp, C., Hornstra, H., Schupp, J.M., Morales, M., Gonzalez, M., Reyes, S., de la Cruz, C., Keim, P., Hartskeerl, R., Trueba, G., Pearson, T., 2016. High *Leptospira* Diversity in Animals and Humans Complicates the Search for Common Reservoirs of Human Disease in Rural Ecuador. PLoS Negl. Trop. Dis. 10. doi:10.1371/journal.pntd.0004990
- Bonvicino, C.R., Oliveira, J. a De, Nacional, M., 2008. Guia dos roedores do Brasil , com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Biologia (Bratisl). 15, 120. doi:10.1590/S0031-10492003000600001
- Cheema, P.S., Srivastava, S.K., Amutha, R., Singh, S., Singh, H., Sandey, M., 2007. Detection of pathogenic leptospires in animals by PCR based on lipL21 and lipL32 genes. Indian J. Exp. Biol. 45, 568–573.
- Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2013. Guia brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais. Brasília.
- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, (CONCEA), 2013. Diretrizes brasileiras para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA. Brasília.
- Cordeiro, F., Sulzer, C.R., Ramos, A.D.A., Almeida, R.A. De, 1981. *Leptospira interrogans* in several wildlife species in southeast Brazil. Pesqui. Vet. Bras. 1, 19–29; 28 ref.
- Corrêa, S.H.R., 2007. Leptospirose, in: Roca (Ed.), Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária. São Paulo, pp. 736–741.
- Cortese, V.S., 2009. Neonatal Immunology. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. doi:10.1016/j.cvfa.2008.10.003
- Costa, F., Porter, F.H., Rodrigues, G., Farias, H., de Faria, M.T., Wunder, E.A., Osikowicz, L.M., Kosoy, M.Y., Reis, M.G., Ko, A.I., Childs, J.E., 2014. Infections

- 1497 by *Leptospira interrogans*, Seoul Virus, and *Bartonella* spp. Among Norway Rats  
 1498 (*Rattus norvegicus*) from the Urban Slum Environment in Brazil. Vector-Borne  
 1499 Zoonotic Dis. 14, 33–40. doi:10.1089/vbz.2013.1378
- 1500 Cutler, S.J., Fooks, A.R., Van Der Poel, W.H.M., 2010. Public health threat of new,  
 1501 reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. Emerg. Infect. Dis.  
 1502 doi:10.3201/eid1601.081467
- 1503 Da Silva, E.F., Félix, S.R., Cerqueira, G.M., Fagundes, M.Q., Neto, A.C.P.S.,  
 1504 Grassmann, A.A., Amaral, M.G., Gallina, T., Dellagostin, O.A., 2010. Short  
 1505 report: Preliminary characterization of *Mus musculus*-derived pathogenic strains of  
 1506 *Leptospira borgpetersenii* serogroup Ballum in a hamster model. Am. J. Trop.  
 1507 Med. Hyg. 83, 336–337. doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0120
- 1508 Daszak, P., Tabor, G.M., Kilpatrick, A.M., Epstein, J., Plowright, R., 2004.  
 1509 Conservation medicine and a new agenda for emerging diseases, in: Annals of the  
 1510 New York Academy of Sciences. pp. 1–11. doi:10.1196/annals.1307.001
- 1511 de Souza, M.A., de Castro, J.R., Moreira, R.Q., Bombonato, N.G., Soares, P.M.,  
 1512 Correia Lima, A.M., 2016. Anti-*Leptospira* spp. Antibodies in Several Animal  
 1513 Species on the Same Farm. Biosci. J. 32, 202–207.
- 1514 Dos Santos Paixão, M., Alves-Martin, M.F., Tenório, M. da S., Starke-Buzetti, W.A.,  
 1515 Alves, M.L., da Silva, D.T., Ferreira, A.G., e Silva, M.F., Sousa, L.O., Lucheis,  
 1516 S.B., 2014. Serology, isolation, and molecular detection of *Leptospira* spp. from  
 1517 the tissues and blood of rats captured in a wild animal preservation centre in Brazil.  
 1518 Prev. Vet. Med. 115, 69–73. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.03.016
- 1519 Draghi, M.G., Brihuega, B., Benítez, D., Sala, J.M., Biotti, G.M., Pereyra, M., Homse,  
 1520 A., Guariniello, L., 2011. [Leptospirosis outbreak in calves from Corrientes  
 1521 Province, Argentina.]. Rev. Argent. Microbiol. 43, 42–44. doi:10.1590/S0325-  
 1522 75412011000100009
- 1523 Drancourt, M., Houhamdi, L., Raoult, D., 2006. *Yersinia pestis* as a telluric, human  
 1524 ectoparasite-borne organism. Lancet Infect. Dis. doi:10.1016/S1473-  
 1525 3099(06)70438-8
- 1526 Duhamel, G.E., Ganley, L., Barr, B.C., Whipple, J.P., Mathiesen, M.R., Nordhausen,  
 1527 R.W., Walker, R.L., Bargar, T.W., Van Kruiningen, H.J., 1998. Intestinal  
 1528 spirochetosis of North American opossums (*Didelphis virginiana*): a potential  
 1529 biologic vector for pathogenic spirochetes, in: Annual Conference-American  
 1530 Association of Zoo Veterinarians. AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO  
 1531 VETERINARIANS, pp. 83–88.
- 1532 Ellis, W.A., 2015. Animal Leptospirosis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 387, 99–137.  
 1533 doi:10.1007/978-3-662-45059-8\_6
- 1534 Ellis, W.A., O'Brien, J.J., Neill, S.D., Hanna, J., 1982. Bovine leptospirosis: serological  
 1535 findings in aborting cows. Vet. Rec. 110, 178–80. doi:10.1136/vr.110.8.178
- 1536 Emmons, L., Feer, F., 1997. Neotropical rainforest mammals: a field guide.
- 1537 Esteves F, Guerra-Neto G, Girio R, Silva-Vergara M, C.A., 2005. Detecção de  
 1538 anticorpos para *Leptospira* spp. em animais e funcionários do zoológico municipal  
 1539 de Uberaba, MG. Arq. Inst. Biol. 72, 283–288.
- 1540 Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P., 1999. Clinical laboratory diagnosis of  
 1541 leptospirosis, *Leptospira* and Leptospirosis.
- 1542 Faria, M.T. de, Calderwood, M.S., Athanzio, D.A., McBride, A.J.A., Hartskeerl, R.A.,  
 1543 Pereira, M.M., Ko, A.I., Reis, M.G., 2008. Carriage of *Leptospira interrogans*  
 1544 among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in  
 1545 Brazil. Acta Trop. 108, 1–5. doi:10.1016/j.actatropica.2008.07.005
- 1546 Fávero, J.F., de Araújo, H.L., Lilenbaum, W., Machado, G., Tonin, A.A., Baldissera,

- 1547 M.D., Stefani, L.M., Da Silva, A.S., 2017. Bovine leptospirosis: prevalence,  
1548 associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microb. Pathog.*  
1549 107, 149–154.
- 1550 Fonseca, G.A.B., Herrmann, G., Leite, Y.L.R., Mittermeier, R.A., Rylands, A.B.,  
1551 Patton, J.L., 1996. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. *Occas. Pap. Conserv.*  
1552 *Biol.* 4, 1–38.
- 1553 Fornazari, F., Langoni, H., Marson, P.M., Nóbrega, D.B., Teixeira, C.R., 2018.  
1554 *Leptospira* reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents. *Acta Trop.* 178,  
1555 205–212. doi:10.1016/j.actatropica.2017.11.019
- 1556 Guernier, V., Richard, V., Nhan, T., Rouault, E., Tessier, A., Musso, D., 2017.  
1557 *Leptospira* diversity in animals and humans in Tahiti, French Polynesia. *PLoS*  
1558 *Negl. Trop. Dis.* 11. doi:10.1371/journal.pntd.0005676
- 1559 Guimarães, L.K.P., 2017. Geoepidemiologia da infecção por *Leptospira* spp. em  
1560 bovinos no Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga.
- 1561 Hudson, P.J., Dobson, A.P., Lafferty, K.D. 2006. Is a healthy ecosystem one that is  
1562 rich in parasites? *TREE*, 21, 381–385.
- 1563 Instituto Nacional de Pesquisa Espacial, (INPE), 2016. Centro de Previsão de Tempo e  
1564 Estudos Climáticos [WWW Document]. URL [www.cptec.inpe.br/cidades](http://www.cptec.inpe.br/cidades)  
1565 (accessed 2.3.17).
- 1566 Jorge, S., Hartleben, C.P., Seixas, F.K., Coimbra, M.A.A., Stark, C.B., Larrondo, A.G.,  
1567 Amaral, M.G., Albano, A.P.N., Minello, L.F., Dellagostin, O.A., Brod, C.S., 2012.  
1568 *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum (*Didelphis*  
1569 *albiventris*): First isolation in Brazil. *Acta Trop.* 124, 147–151.  
1570 doi:10.1016/j.actatropica.2012.07.009
- 1571 Ko, A.I., Galvão Reis, M., Ribeiro Dourado, C.M., Johnson, W.D., Riley, L.W., 1999.  
1572 Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet* 354, 820–825.  
1573 doi:10.1016/S0140-6736(99)80012-9
- 1574 Ko, A.I., Goarant, C., Picardeau, M., 2009. *Leptospira*: The dawn of the molecular  
1575 genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.*  
1576 doi:10.1038/nrmicro2208
- 1577 Köppen, W., 1948. *Climatologia*. México. Fundo Cult. Econômica.
- 1578 Langoni, H., de Souza, L.C., Da Silva, A.V., Cunha, E.L.P., da Silva, R.C., 2008.  
1579 Aspectos epidemiológicos nas leptospiroses: Pesquisa de anticorpos anti-  
1580 *Leptospira* spp, isolamento e pesquisa biomolecular em bovinos, roedores e  
1581 trabalhadores de propriedades rurais do Município de Botucatu, SP, Brasil.  
1582 *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 45, 190–199.
- 1583 Lee, G., Goosens, K.A., 2015. Sampling Blood from the Lateral Tail Vein of the Rat. *J.*  
1584 *Vis. Exp.* doi:10.3791/52766
- 1585 Levett, P.N., Fonseca, K., Tsang, R.S., Kadkhoda, K., Serhir, B., Radons, S.M.,  
1586 Morshed, M., 2015. Canadian Public Health Laboratory Network laboratory  
1587 guidelines for the use of serological tests (excluding point-of-care tests) for the  
1588 diagnosis of syphilis in Canada. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* = *J. Can. des*  
1589 *Mal. Infect. la Microbiol. medicale* 26 Suppl A, 6A–12A.
- 1590 Lilenbaum, W., Ribeiro, V., Martin, E., Bispo, V., 1993. Estudo sorológico para  
1591 detecção de anticorpos anti-leptospira em *Rattus norvegicus* de Duque de Caxias,  
1592 Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 35, 357–380.
- 1593 Lilenbaum, W., Souza, G.N., 2003. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio  
1594 de Janeiro, Brazil. *Res. Vet. Sci.* 75, 249–251. doi:10.1016/S0034-5288(03)00114-  
1595 0
- 1596 Magajevski, F.S., Silva Girio, R.J., Mathias, L.A., Myashiro, S., Genovez, M.É.,

- Scarcelli, E.P., 2005. Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. Brazilian J. Microbiol. 36, 43–47. doi:10.1590/S1517-83822005000100009
- Martins, E.G., Bonato, V., Pinheiro, A., dos Reis, S.F., 2006. Variation in the food-niche width of *Gracilinanus microtarsus* (Didelphimorphia: Didelphidae) in a cerrado remnant in south-eastern Brazil. Mamm. Biol. 71, 304–308. doi:10.1016/j.mambio.2006.03.001
- McCallum, H., Barlow, M., Hone, J. 2001. How should pathogen transmission be modelled? TREE, 16, 295–300.
- McClean, M., Ruscoe, Q., Kline, T., King, C., Nesdale, A., 2014. A cluster of three cases of leptospirosis in dairy farm workers in New Zealand. N. Z. Med. J. 127, 13–20.
- Mgode, G.F., Machang'u, R.S., Mhamphi, G.G., Katakweba, A., Mulungu, L.S., Durnez, L., Leirs, H., Hartskeerl, R.A., Belmain, S.R., 2015. *Leptospira* Serovars for Diagnosis of Leptospirosis in Humans and Animals in Africa: Common *Leptospira* Isolates and Reservoir Hosts. PLoS Negl. Trop. Dis. 9. doi:10.1371/journal.pntd.0004251
- Miller, R.S., Farnsworth, M.L., Malmberg, J.L., 2013. Diseases at the livestock-wildlife interface: Status, challenges, and opportunities in the United States. Prev. Vet. Med. 110, 119–132. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.11.021
- Mittermeier, R.A., Myers, N., Mittermeier, C.G., Robles, G., 1999. Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX, SA, Agrupación Sierra Madre, SC.
- Moreira, R.Q., Cabral, D.D., Lima, A.M.C., Oliveira, P.R., 2010. Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Leptospira interrogans* em duas propriedades de vacas leiteiras com relatos de prejuízos reprodutivos no município de Goiandira, Goiás. Ciência Anim. Bras. 11, 396–401.
- Muthukkaruppan, V., Hartskeerl, R., Priya, C., Hoogendijk, K., Berg, M., Rathinam, S., Ahmed, A., 2007. Field rats form a major infection source of leptospirosis in and around Madurai, India. J. Postgrad. Med. 53, 236. doi:10.4103/0022-3859.37511
- Nakamura, I., Hang-Ombe, B.M., Sawa, H., Kobayashi, S., Orba, Y., Ishii, A., Thomas, Y., Isozumi, R., Yoshimatsu, K., Mweene, A.S., Takada, A., Sugimoto, C., Arikawa, J., 2013. Cross-Reactivity of Secondary Antibodies against African Rodents and Application for Sero-Surveillance. J. Vet. Med. Sci. 75, 819–825. doi:10.1292/jvms.12-0471
- Obiegala, A., Woll, D., Karnath, C., Silaghi, C., Schex, S., Eßbauer, S., Pfeffer, M., 2016. Prevalence and Genotype Allocation of Pathogenic *Leptospira* Species in Small Mammals from Various Habitat Types in Germany. PLoS Negl. Trop. Dis. 10. doi:10.1371/journal.pntd.0004501
- Oliveira-Filho, A.T., Ratter, J.A., 2002. Vegetation Physiognomies and Wood Flora of the Cerrado Biome, in: The Cerrados of Brazil. pp. 91–120. doi:10.1663/0013-0001(2003)057[0656:DFABRE]2.0.CO;2
- Pereira, M.M., Pereira Da Silva, J.J., Pinto, M.A., Da Silva, M.F., Machado, M.P., Lenzi, H.L., Marchevsky, R.S., 2005. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): A new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 72, 13–20. doi:10.1186/1529-2906.72.1.13 [pii]
- Petrakovsky, J., Bianchi, A., Fisun, H., Nájera-Aguilar, P., Pereira, M.M., 2014. Animal leptospirosis in Latin America and the caribbean countries: Reported outbreaks and literature review (2002–2014). Int. J. Environ. Res. Public Health. doi:10.3390/ijerph111010770
- Pinheiro, F., Diniz, I.R., Coelho, D., Bandeira, M.P.S., 2002. Seasonal pattern of insect



- abundance in the Brazilian cerrado. *Austral Ecol.* 27, 132–136. doi:10.1046/j.1442-9993.2002.01165.x
- Primack, R.B., Rodrigues, E., 2001. *Biologia da conservação*, Editora Planta. doi:10.4257/oeco.2009.1303.01
- R Development Core Team, 2016. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Found. Stat. Comput. Vienna Austria 0, {ISBN} 3-900051-07-0. doi:10.1038/sj.hdy.6800737
- Ramos, V.D.N., 2007. *Ecologia alimentar de pequenos mamíferos de áreas de cerrado no sudeste do Brasil*. (2007), 68.f. *Ecol. Aliment. pequenos mamíferos áreas cerrado no sudeste do Bras.* Mestr. em Ecol. e Conserv. Recur. Naturais. Univ. Fed. Uberlândia, Uberlândia.
- Reilly, J.R., 1970. The susceptibility of five species of wild animals to experimental infection with *Leptospira grippotyphosa*. *J. Wildl. Dis.* 6, 289–294. doi:10.7589/0090-3558-6.4.289
- Sarkar, U., Nascimento, S.F., Barbosa, R., Martins, R., Nuevo, H., Kalafanos, I., Grunstein, I., Flannery, B., Dias, J., Riley, L.W., Reis, M.G., Ko, A.I., 2002. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 605–610. doi:10.4269/ajtmh.2002.66.605
- Schoonman, L., Swai, E.S., 2010. Herd- and animal-level risk factors for bovine leptospirosis in Tanga region of Tanzania. *Trop. Anim. Health Prod.* 42, 1565–1572. doi:10.1007/s11250-010-9607-1
- Silva, I., 1976. A new leptospiral serotype isolated in Salvador, Bahia state. *Rev. Microbiol.* 7, 35–37.
- Silva, F.J. da, 2014. *Epidemiologia da infecção por Leptospira spp. em áreas rurais nos biomas brasileiros*.
- Sobestiansky, J., Barcellos, D., Mores, N., Carvalho, L.F., Oliveira, S., 1999. *Clínica e patologia suína*, 2ed ed. Goiânia.
- Stoddard, R.A., Gee, J.E., Wilkins, P.P., McCaustland, K., Hoffmaster, A.R., 2009. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64, 247–255. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014
- Stritof Majetic, Z., Galloway, R., Ruzic Sabljic, E., Milas, Z., Mojcec Perko, V., Habus, J., Margaletic, J., Pernar, R., Turk, N., 2014. Epizootiological survey of small mammals as *Leptospira* spp. reservoirs in Eastern Croatia. *Acta Trop.* 131, 111–116. doi:10.1016/j.actatropica.2013.12.009
- Sunbul, M., Esen, S., Leblebicioglu, H., Hokelek, M., Pekbay, A., Eroglu, C., 2001. *Rattus norvegicus* acting as reservoir of leptospira interrogans in the Middle Black Sea region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to *Leptospira* strain. *Scand. J. Infect. Dis.* 33, 896–898. doi:10.1080/00365540110076796
- Thibeaux, R., Geroult, S., Benezech, C., Chabaud, S., Soupé-Gilbert, M.E., Girault, D., Bierque, E., Goarant, C., 2017. Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11. doi:10.1371/journal.pntd.0005414
- Thiermann, A.B., 1980. Canine leptospirosis in Detroit. *Am. J. Vet. Res.* 41, 1659–1661.
- Thrusfield, M., 2010. *Veterinary epidemiology*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Vieira, A.S., Narduche, L., Martins, G., Schabib Péres, I.A.H.F., Zimmermann, N.P., Juliano, R.S., Pellegrin, A.O., Lilenbaum, W., 2016. Detection of wild animals as

1697 carriers of *Leptospira* by PCR in the Pantanal biome, Brazil. *Acta Trop.* 163, 87–  
1698 89. doi:10.1016/j.actatropica.2016.08.001  
1699 Vinetz, J.M., Glass, G.E., Flexner, C.E., Mueller, P., Kaslow, D.C., 1996. Sporadic  
1700 Urban Leptospirosis. *Ann. Intern. Med.* 125, 794–798.  
1701 doi:10.3402/jchimp.v1i1.7042  
1702 Yalin, W., Lingbing, Z., Hongliang, Y., Jianmin, X., Xiangyan, Z., Xiaokui, G., Utpal,  
1703 P., Jinhong, Q., 2011. High prevalence of pathogenic *Leptospira* in wild and  
1704 domesticated animals in an endemic area of China. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4,  
1705 841–845. doi:10.1016/S1995-7645(11)60205-8  
1706  
  
1707  
  
1708  
  
1709  
  
1710  
  
1711  
  
1712  
  
1713  
  
1714  
  
1715  
  
1716  
  
1717  
  
1718  
  
1719  
  
1720  
  
1721

1722

1723

1724

1725

1726

1727

1728

## CAPÍTULO 4

1729

1730 **Carrapatos de pequenos mamíferos do vale do rio Paranaíba, uma região de**  
1731 **ecótono impactada por atividades agropecuárias (*Short Communication*)**

1732

1733

1734

1735

1736

1737

1738

1739

1740

1741

**Carrapatos de pequenos mamíferos do vale do rio Paranaíba, uma região de ecótono impactada por atividades agropecuárias (*Short Communication*)**

**Resumo**

O rio Paranaíba está localizado predominantemente no bioma Cerrado, e a área de sua bacia detêm pouco mais de 20% de vegetação nativa. Os pequenos mamíferos são modelos aplicáveis no estudo de carrapatos e circulação de patógenos, inclusive em ambientes com diferentes graus de degradação. Diante disso, teve-se por objetivo avaliar o papel desses animais como hospedeiros para carrapatos em áreas de Cerrado com diferentes características de fragmentação no vale do rio Paranaíba (regiões do Alto, Médio e Baixo Paranaíba). Foram capturados 72 espécimes de pequenos mamíferos pertencentes a três gêneros de marsupiais (*Micoureus*, n = 4; *Gracilinanus*, n = 34; e *Didelphis*, n = 1) e oito de roedores (*Akodon* n = 3; *Calomys*, n = 4; *Necomys*, n = 4; *Cerradomys*, n = 4; *Hylaeamys*, n = 4; *Necomys*, n = 3; *Oecomys*, n = 10; *Rhipidomys*, n = 1; *Mus*, n = 1; e *Rattus*, n = 3). Destes, apenas 14 animais, correspondentes a cinco gêneros (*Necomys*, *Cerradomys*, *Oecomys*, *Necomys* e *Gracilinanus*) estavam infestados por carrapatos. A maior prevalência de animais infestados foi no período seco do ano (21,16%; 11/52), enquanto no período chuvoso a prevalência foi de 15% (3/20). A riqueza de carrapatos foi de pelo menos 04 espécies no Alto Paranaíba (*Ixodes* sp., *Ornithodoros* sp., *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma sculptum*) além de larvas de *Amblyomma* sp.; 02 no Médio Paranaíba (*Ornithodoros* sp. e *Amblyomma dubitatum*), e larvas de *Amblyomma* sp.; e apenas 01 no Baixo Paranaíba (*Ornithodoros* sp.). Carrapatos do gênero *Ornithodoros* sp. foram encontrados parasitando apenas o didelfídeo *Gracilinanus* sp. O carrapato da espécie *Amblyomma dubitatum* foi o de maior ocorrência em pequenos mamíferos do vale do rio Paranaíba, e este parece ser o primeiro registro desta espécie em *Necomys* sp. no bioma Cerrado. Como também o primeiro registro de

1768 *Ixodes loricatus* parasitando *Cerradomys* sp., e o primeiro registro de *Ixodes loricatus* em  
1769 *Rhipidomys* sp. no Brasil.

1770

1771 **Palavras-chave:**

1772 Ecologia, *Amblyoma sculptum*, *Amblyoma dubtatum*, *Ornithodoros*, *Ixodes*

1773

1774 **Introdução**

1775 Carrapatos estão entre os principais vetores de patógenos que afetam humanos e  
1776 animais, causando grande impacto na pecuária e saúde pública (Cleaveland et al., 2001;  
1777 Guimarães et al., 2001; Jongejan e Uilenberg, 2004). Estão envolvidos na transmissão de  
1778 importantes zoonoses como Doença de Lyme e Febre Maculosa (Ostfield e Keesing,  
1779 2000; Sangioni et al., 2005; Thorner et al., 1998).

1780 Ações antrópicas contrárias a conservação da biodiversidade promovem  
1781 alterações no equilíbrio natural entre hospedeiros, vetores e patógenos, neste sentido  
1782 estudos ecológicos sobre carrapatos e seus hospedeiros são relevantes para a compreensão  
1783 das consequências causadas por esse desequilíbrio natural (LoGiudice et al., 2003;  
1784 Ostfield e Keesing, 2000; Wimberly et al., 2008), e consequentemente auxiliando para  
1785 elaboração de ações mitigadoras dos problemas resultantes dessas alterações (Brownstein  
1786 et al., 2003; Fisch, 1995; Prusinski et al., 2006).

1787 O bioma Cerrado é o segundo maior do Brasil e um dos “hot spots” da  
1788 biodiversidade global (Cincotta, 2000; Ratter et al., 2003), apenas 20% da sua área  
1789 original ainda está preservada, dos quais somente 2,2% estão legalmente protegidos  
1790 (Milttermeier et al., 1999). Entretanto estima-se que 20% de espécies endêmicas deste  
1791 bioma não ocorram nas áreas legalmente protegidas (Klink, Machado, 2005), o que chama  
1792 atenção para o estudo e preservação dessas áreas fora de parques e reservas ecológicas.

A Bacia do Rio Paranaíba está inserida no bioma Cerrado, e apresenta áreas com manchas características de Mata Atlântica. Em função de atividades antrópicas, em apenas 21,8% da área total ainda resta vegetação nativa (ANA, 2013). Nesse sentido, sua localização e importância econômica tornam a sua área vulnerável e sujeita a forte e constante perda de hábitat, o que pode favorecer algumas espécies em detrimento de outras (Andren, 1994; Bender et al., 1998; Bennett, 1990; Brooks et al., 2002; Buchmann et al., 2013; Johnstone e Reina, 2014; Schlinkert et al., 2016).

Alguns dos grupos de pequenos mamíferos não voadores, importantes hospedeiros de formas imaturas de carrapatos, e o grupo dos carrapatos, como o *Amblyomma sculptum*, são favorecidos por esses efeitos antropogênicos, como a perda de áreas florestadas, apresentando aumento de suas populações (Galvão et al., 2005; Szabó et al., 2013). Diante disso, objetivou-se, por meio deste trabalho, avaliar o papel de pequenos mamíferos não voadores como hospedeiros para carrapatos em áreas de Cerrado com diferentes características de fragmentação no vale do Rio Paranaíba, nos estados de Minas Gerais e Goiás.

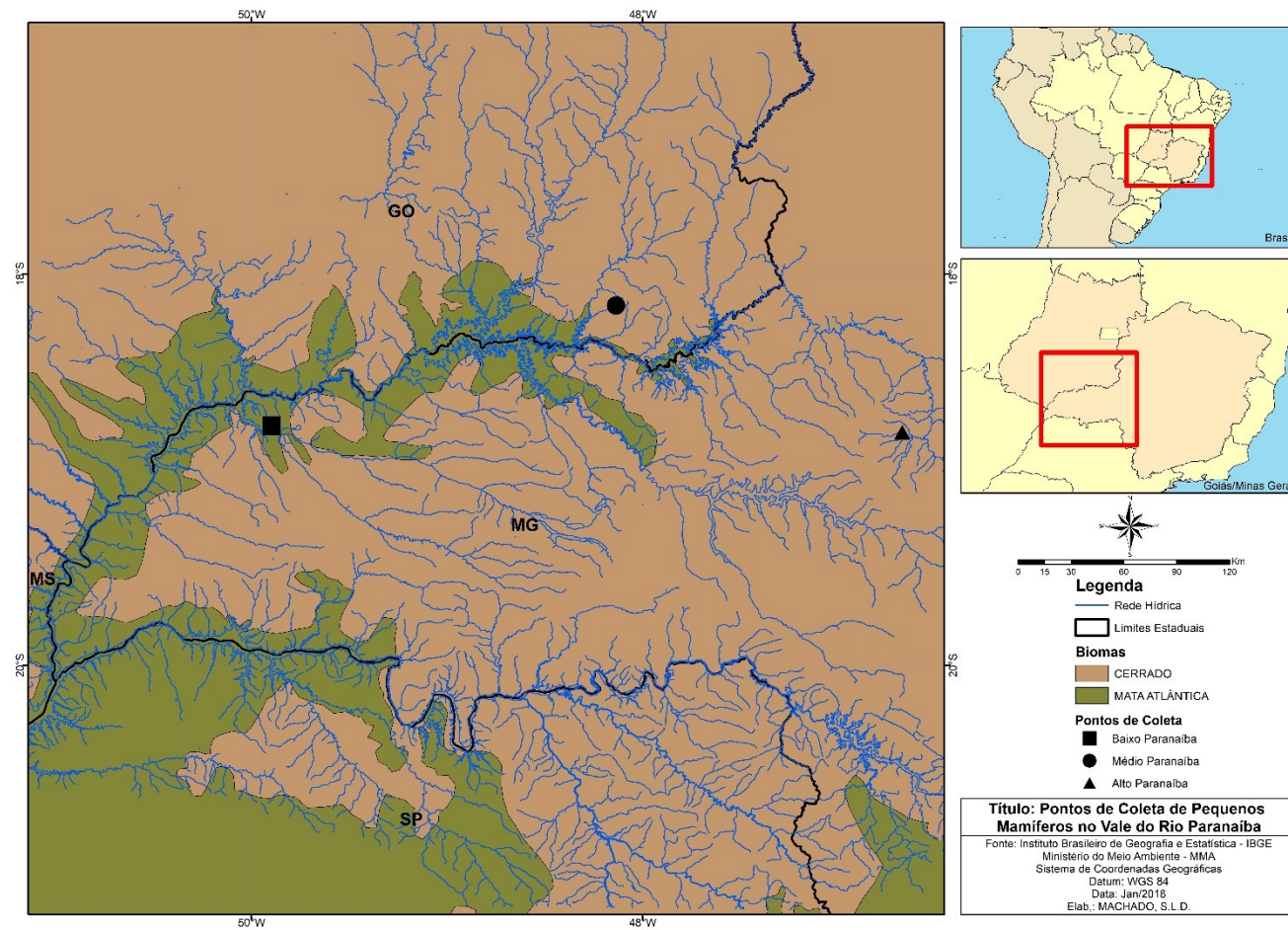
## **Material e Métodos**

### *Área de estudo*

O estudo foi conduzido em áreas rurais de três municípios ao longo do vale do rio Paranaíba, todos impactados pela atividade agropecuária. Se fez a distinção entre as matrizes de cada área conforme o tipo de atividade agropecuária, e as características da vegetação remanescente. Área 1- Alto Paranaíba (Guimarânia, Minas Gerais, 18,8101944S; 46,6755278W); matriz composta por culturas comerciais de inhame (*Dioscorea alata*), soja (*Glycine max*), milho (*Zea mays*) e eucalipto (*Eucalyptus* sp.), com faixas de matas conectadas (Cerrado e Mata Atlântica – região de ecótono)

1818 margeando corpos de água. Área 2 – Médio Paranaíba (Goiandira, Goiás, 18,1630556S;  
1819 48,1354722W): matriz composta por pastagens com fragmentos de matas (Cerrado e  
1820 Mata Atlântica – região de ecótono); Área 3 – Baixo Paranaíba (Ipiaçu, Minas Gerais,  
1821 18,7770833S; 49,8978889W): predominância de culturas de cana-de-açúcar (*Saccharum*  
1822 *officinarum*), com manchas isoladas de remanescentes florestais de Cerrado.

1823       Em cada sítio de estudo foram amostrados locais próximos a habitações humanas,  
1824 definidos como ambiente antrópico, como paióis, casas de máquinas, galpões de  
1825 armazenamento de insumos, além de três outros tipos de ambiente; Mata estacional  
1826 decidual e semidecidual: estrato arbóreo que durante a estação seca perde toda ou parte  
1827 das folhas (Oliveira-Filho e Ratter, 2002); Matas ribeirinhas: matas estacionais  
1828 semidecíduais ou decíduais que acompanham a margem de cursos d'água (Oliveira-Filho  
1829 e Ratter, 2002); e Pasto sujo: área de gramínea usada para pastoreio do gado (*Brachiaria*  
1830 *decumbens* nas áreas 1 e 2, e *Panicum maximun* na área 3) associados a arbustos. Essas  
1831 pastagens são margeadas pelas formações florestais descritas anteriormente. O clima é  
1832 classificado como Aw (Köppen, 1948), com uma estação seca entre abril e setembro, e  
1833 uma estação úmida de outubro a março, podendo haver variações quanto ao início e  
1834 término de cada estação climática.



1835

1836 **Figura 1.** Distribuição espacial dos biomas Mata Atlântica e Cerrado, e localização dos pontos de coletas de pequenos mamíferos não voadores no

1837 vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.





1838

1839 **Figura 2.** Matriz de cobertura vegetal dos pontos de coletas na região do vale do rio Paranaíba. A) Ipiacu-MG (Baixo Paranaíba), B) Goiandira-  
1840 GO (Médio Paranaíba), C) Guimarães-MG (Alto Paranaíba), 2016.

1841 Fonte: Google Earth

1842

1843

1844

### *Captura de pequenos mamíferos*

Em cada um dos três sítios de estudo, duas campanhas foram conduzidas para captura de pequenos mamíferos, sendo a primeira no final da estação úmida (março-abril de 2016) e uma no final da seca (setembro de 2016). Foram utilizadas armadilhas dos modelos *Sherman* e *Tomahawk*, iscadas com rodela de banana cobertas por farelo de paçoca (Limongi et al., 2016; Ramirez, 2017; Ramos, 2013). Para captura de roedores sinantrópicos foram utilizadas, em média, oito armadilhas tipo *Sherman* colocadas em variados pontos considerados propícios. Para ambientes de matas decíduas e semidecíduas e de mata de galeria, 50 armadilhas tipo *Sherman* foram montadas em cada uma das duas fisionomias, dispostas em linhas com estações de captura a cada dez metros, sendo uma armadilha instalada sobre o solo e outra sobre uma árvore em cada estação. No ambiente de pasto sujo, oito armadilhas tipo *Tomahawk*, e oito tipo *Sherman* foram colocadas linearmente sobre o solo, com espaço de dez metros entre cada uma delas.

Todas as armadilhas foram inspecionadas diariamente pela manhã, tendo a isca trocada a cada 48 horas ou repostada quando necessário. Em todos ambientes e áreas, foram conduzidas quatro noites de capturas por campanha, totalizando um esforço de 2.976 armadilhas-noite durante o estudo.

Os animais capturados foram anestesiados com a associação de cloridrato de tiletamina 250mg com cloridrato de zolazepan 250mg na dose de 0,1mL/Kg pela via intramuscular (Silva, 2014) para biometria, sexagem e coleta de carrapatos. As fêmeas prenhes e em amamentação foram acondicionadas em sacos de algodão até o retorno completo da anestesia, e posteriormente soltas nos seus respectivos locais de captura. Os demais espécimes foram eutanasiados por exsanguinação intracardiaca (Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2013; CONCEA, 2013). Os procedimentos foram autorizados pelo Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (Protocolo 52983/1) e pela

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia  
sob número de protocolo 151/16.

### *Coleta e identificação de carrapatos*

Toda a superfície corporal dos pequenos mamíferos foi completamente inspecionada à procura de carrapatos. Os carrapatos não alimentados foram preservados em isopropanol e aqueles ingurgitados foram mantidos vivos para completar ecdise (em estufas tipo B.O.D., a 85% de umidade e 27°C). Adicionalmente, carrapatos do ambiente foram coletados através de arraste de flanela (Oliveira et al., 2000), por conveniência, e pela inspeção da roupa e corpo dos pesquisadores. A identificação taxonômica foi feita sob lupa estereoscópica com auxílio de chaves de identificação (Martins et al., 2010; Onófrio et al., 2006) e comparação com coleção de referência (Coleção de Carrapatos da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais). A identificação de larvas de *Amblyomma* e *Ornithodoros* foram restringidas ao gênero, as demais, assim como ninfas e adultos foram identificados em espécies.

### *Análises*

A prevalência, (número de hospedeiros infestados/número total de hospedeiros capturados), a intensidade média de infestação (número total de carrapatos/número de hospedeiros infestados) (Bush et al., 1997) e a mediana de carrapatos por hospedeiros foram calculados. Áreas e ambientes foram comparados pelo teste de medianas de Mood (intensidade mediana) e exato de Fisher ou Qui-quadrado (prevalências), usando o programa *Quantitative Parasitology* (Reiczigel e Rózsa, 2005). A taxa total de captura (número de hospedeiros capturados/esforço de captura) foi calculada para cada área de estudo (1, 2 e 3) e para os diferentes ambientes (pasto sujo, ambiente antrópico e matas).

## Resultados

Setenta e dois espécimes de pequenos mamíferos não voadores foram capturados. Destes, três espécies de marsupiais didelfídeos (*Micoureus*, n = 4; *Gracilinanus*, n = 34; e *Didelphis*, n = 1) e oito roedores cricetídeos e murídeos (*Calomys*, n = 4; *Akodon*, n = 3; *Cerradomys*, n = 4; *Hylaeamys*, n = 4; *Nectomys*, n = 3; *Rhipidomys*, n = 1; *Oecomys*, n = 10; *Mus*, n = 1; e *Rattus*, n = 3). Apenas 14 indivíduos estavam infestados por carrapatos (Tabela 1).

A taxa de captura foi maior na estação seca, assim como os níveis de infestação do hospedeiro por carrapato. Na estação úmida, dos 20 animais capturados, apenas três apresentaram carrapatos. Na estação úmida, 20 animais foram capturados, e apenas três estavam infestados (uma ninfa de *Amblyomma dubitatum* e 38 larvas de *Amblyomma* sp.). Em ambas formações florestadas, (matas ribeirinhas e matas decíduas e semi decíduas) apresentaram o carrapato argasídeo *Ornithodoros*, mas nos hospedeiros de matas ribeirinhas foram identificadas apenas duas espécies de *Amblyomma*. De modo geral, a prevalência ( $p = 0,266$ ) e a intensidade mediana de infestação ( $p = 0,835$ ) foram similares nos dois ambientes de matas.

O número de pequenos mamíferos não voadores capturados foi semelhante nas três áreas de estudo (27 na área 3, 28 na Área 2 e 17 na Área 1). Os ambientes de matas, no total e por área, apresentaram uma maior taxa de captura (1,8%). A prevalência ( $p = 0,228$ ) e a intensidade mediana de infestação ( $p = 0,767$ ) também foram similares entre as áreas 1, 2 e 3. Considerando todas as espécies de carrapatos, a Área 1 apresentou 25,92% de prevalência, e uma intensidade média de 4,0 carrapatos por hospedeiro. A Área 2 apresentou 21,43% e 1,5 carrapatos por hospedeiros, e a Área 3, 5,88% e 1.0 carrapato por hospedeiro.

1919 Carrapatos em vida livre, coletados por arraste e das roupas e pele dos  
1920 pesquisadores, foram mais numerosos durante a estação seca (109 ninfas de *A. sculptum*  
1921 e um bolo de larvas de *Amblyomma* sp.). Durante a estação chuvosa foram encontrados  
1922 três bolos de larvas de *Amblyomma* sp., sete adultos de *A. sculptum* e um bolo de larvas  
1923 de *Rhipicephalus microplus*. Apenas as larvas de *R. microplus* estavam associadas ao  
1924 pasto. Todos os outros espécimes foram coletados nas áreas de mata.  
1925

1926 Tabela 1. Parâmetros de infestação para carrapatos em pequenos mamíferos capturados no ano de 2016, no vale do rio Paranaíba, Brasil,  
 1927 considerando a área de estudo, a espécie do hospedeiro e o ambiente de captura. FR: Florestas Ribeirinhas, NR: Florestas Não-ribeirinhas, PS:  
 1928 Pasto sujo, AA: Ambiente antrópico, L: larva, N: ninfa.

Hospedeiros	Ambiente (capturas)				Espécies de carrapatos [número de carrapatos - Prevalência (%) – Intensidade média - Mediana]				
	FR	NR	PS	AA	<i>Amblyomma</i> sp.	<i>Amblyomma sculptum</i>	<i>Amblyomma dubitatum</i>	<i>Ixodes loricatus</i>	<i>Ornithodoros</i> sp.
AREA 1. ALTO PARANAÍBA									
<i>Nectomys squamipes</i>	3*	0	0	0	38L - 100 - 12.7 - 0	0	3N - 66.6 - 1.5 - 0	1L - 33.3 - 1 - 0	0
<i>Rhipidomys</i> sp.	1*	0	0	0	0	1N - 100 - 1 - 0	0	3L - 100 - 3 - 0	0
<i>Gracilinanus agilis</i>	9*	4	0	0	0	0	0	0	2L - 7.1 - 2 - 0
<i>Micoureus</i> cf. <i>paraguaianus</i>	3	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Akodon</i> sp.	1*	1	0	1	0	0	1N - 33.3 - 1 - 0	0	0
<i>Cerradomys</i> sp.	1	0	1*	0	2L - 50.0 - 2 - 0	0	0	3L - 50.0 - 3 - 0	0
<i>Calomys</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AREA 2. MÉDIO PARANAÍBA									
<i>Gracilinanus agilis</i>	3*	11*	0	0	0	0	0	0	6L - 35.7 - 1.2 - 0
<i>Nectomys squamipes</i>	1*	0	0	0	1 - 100 - 1 - 0	0	21N - 100 - 21 - 0	0	0
<i>Hylaeamys megacephalus</i>	3	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Calomys</i> sp.	0	0	3	0	0	0	0	0	0
<i>Oecomys</i> c.f. <i>bicolor</i>	2	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rattus rattus</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0
AREA 3. BAIXO PARANAÍBA									
<i>Gracilinanus agilis</i>	2	5*	0	0	0	0	0	0	1L - 14.3 - 1 - 0
<i>Didelphis albiventris</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Oecomys</i> c.f. <i>bicolor</i>	6	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mus musculus</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0

1929 Asteriscos (\*) indicam os hospedeiros infestados.

## 1930 **Discussão**

1931

1932           Em geral, captura-se maior número de pequenos mamíferos durante a estação seca  
 1933 (Rocha, 2011; Vieira, 1997), inclusive em áreas degradadas de Cerrado (Coelho et al.,  
 1934 2016; Limongi et al., 2016). Esse maior sucesso da captura pode estar associado à menor  
 1935 disponibilidade de recursos alimentares no meio ambiente em sistemas mais restritivos.  
 1936 Esse padrão também ocorreu no presente estudo. Além disso, a abundância dos carrapatos  
 1937 é maior durante os meses mais secos no Brasil, principalmente para *Amblyomma* (Labruna  
 1938 et al., 2002). Então, nesta estação, foi possível capturar um número maior de hospedeiros  
 1939 infestados, como foi observado em todas as áreas deste estudo. Entretanto, pouco se sabe  
 1940 sobre a ecologia e o comportamento dos *Ixodes* e *Ornithodoros* de vida livre,  
 1941 diferentemente dos carrapatos do gênero *Amblyomma*.

1942           Registrou-se uma forte associação entre carrapatos e ambientes florestais. Este  
 1943 fato foi observado para carrapatos de vida livre (principalmente *A. sculptum*) e para  
 1944 carrapatos parasitando pequenos mamíferos. As áreas florestais oferecem  
 1945 microambientes mais adequados para períodos não-parasitários de carrapatos (Ramos et  
 1946 al., 2016), em comparação com pastagens ou áreas antrópicas. A matéria orgânica no solo  
 1947 (liteira), sombra e umidade são favoráveis à oviposição, ecdise e espera por hospedeiros.  
 1948 Sabe-se que *A. sculptum* pode ser mantido em pastos sujos, associado à presença de um  
 1949 hospedeiro primário, como cavalos (Labruna, 2008; Labruna et al., 2001). Nesta pesquisa,  
 1950 porém, as pastagens foram essencialmente compostas por *Brachiaria decumbens* e  
 1951 *Panicum maximun*, com uso mais frequente de gado, e apenas presença ocasional de  
 1952 cavalos. Logo, o impacto da agropecuária favoreceu a presença das espécies de carrapatos  
 1953 encontradas nas três áreas de estudo, em ambientes florestados em detrimento de  
 1954 ambientes com pastagens.

O carrapato mais abundantemente coletado em estágios não parasitários foi *A. sculptum*, mas apenas um espécime foi observado sobre um roedor (*Rhipidomys* sp.). No entanto, essa única ninfa de *A. sculptum* não estava ingurgitada e nem fixada ao corpo do roedor. Esta espécie de carrapato já foi relatada parasitando *Cerradomys*, *Gracilinanus* e *Micoureus* no bioma Cerrado (Saraiva et al., 2012) e no Pantanal, em *Thrichomys* e *Monodelphis* (Ramos, 2013). É preciso salientar, porém, que de forma semelhante ao nosso estudo, esses relatos se referem a baixos níveis de infestação, e quando a informação é mencionada, os carrapatos não estavam fixados ou ingurgitados, reforçando a hipótese de falta de afinidade entre pequenos mamíferos e *A. sculptum*.

*Amblyomma dubitatum* ocorreu em maior número nos pequenos mamíferos, mas a prevalência foi semelhante às outras espécies de carrapatos. Os três estágios de *A. dubitatum* (larvas, ninfas e adultos) são encontradas parasitando capivaras (*Hydrochoerus hydrochaerys*) (Aragão, 1936; Nava et al., 2010), e as fases de vida livre estão associadas a áreas úmidas (Debárbora et al., 2014; Nava et al., 2010; Queirogas et al., 2012; Szabó et al., 2007). E é notada uma coincidência no ambiente de vida de capivaras e *Nectomys squamipes*, o que pode justificar a quantidade de *A. dubitatum* parasitando este pequeno mamífero.

Além de se encontrar *A. dubitatum* em *Nectomys squamipes*, pôde-se registrar o mesmo parasitismo em *Akodon* sp. nas Áreas 1 e 2. *N. squamipes* já foi observado sendo parasitado por *A. dubitatum* em área Mata Atlântica do Nordeste do Brasil (Dantas-Torres et al., 2010), mas ainda não existem relatos desta relação hospedeiro-carrapato em áreas do Cerrado. Para o *Akodon* sp., esta associação já foi descrita para algumas espécies do gênero (Debárbora et al., 2012; Ramirez, 2017), mas não no bioma Cerrado

Larvas de *Ixodes loricatus* foram encontradas infestando *N. squamipes*, *Cerradomys* sp. e *Rhipidomys* sp. A associação entre *Nectomys* e *Ixodes* tem sido



recorrente no Brasil (Labruna et al., 2003; Onofrio et al., 2013; Saraiva et al., 2012a; Ramirez, 2017, Lamattina et al., 2018). Em áreas de Cerrado, entretanto, e para *I. loricatus*, o parasitismo é mais frequente em outros pequenos mamíferos, como *Didelphis albiventris* e *Oecomys* sp. (Pascoli, 2014; Coelho et al., 2016). Neste estudo, todos os três gêneros de hospedeiros infestados por *I. loricatus* foram capturados na floresta ribeirinha da Área 1. Isso pode implicar em alguma especificidade ambiental desse carrapato, porque em outros biomas, e também no Cerrado, *Ixodes* também são frequentemente relatados em ambientes florestais (Arzua et al., 2003; Barros-Battesti et al., 2000; Díaz et al., 2009; Luz et al., 2013; Pascoli, 2014; Martins et al., 2014; Coelho et al., 2016; Ramirez, 2017). Para o parasitismo de *Rhipidomys* sp. por *Ixodes*, existe apenas um relato na Venezuela (Durden e Keirans, 1994), e para a relação de *I. loricatus* e *Cerradomys* parece ser esse o primeiro relato.

O marsupial didelfídeo *Gracilinanus agilis* foi infestado unicamente por *Ornithodoros* sp., em todas as três áreas de captura, demonstrando um parasitismo não ocasional. Como já foi observado, *G. agilis* e outras espécies arbóreas já foram relatadas infestadas por *Ornithodoros mimon* no Cerrado e Pantanal (Ramos, 2013; Martins et al., 2014; Sponchiado et al., 2015). Este carrapato é um argasídeo, e muitas espécies desta família apresentam hábitos nidícolas, realizando seu ciclo de vida no abrigo do hospedeiro (Balashov, 1972, Sonenshine et al., 2002). Algumas espécies de *Ornithodoros* que parasitam morcegos, são encontrados dentro dos buracos das árvores utilizados por seus hospedeiros (Muñoz-Leal et al., 2016). *G. agilis* é um marsupial arbóreo, e o local de infestação por *Ornithodoros* pode estar associado a este tipo de abrigo.

No bioma Cerrado, em áreas não pertencentes a unidades de conservação, a vegetação original é restrita a pequenos fragmentos, e imersos em paisagens agrícolas, e áreas de criação de animais de produção. Em geral, essas manchas de vegetação estão

2005 associadas a corpos aquáticos, como córregos e rios. Essas áreas são particularmente  
2006 propensas à agricultura e estão ameaçadas por esta atividade econômica (Oliveira-Filho  
2007 e Ratter, 2002).

2008 Este é o caso da região deste estudo. No entanto, existem diferenças entre as três  
2009 áreas que podem ser influenciadas no padrão hospedeiro-carrapato observado, apesar dos  
2010 parâmetros de infestação semelhantes nas áreas. A Área 1 apresentou maior número de  
2011 espécies de carrapatos. Esta região apresenta muitos remanescentes de Mata Atlântica  
2012 (ANA, 2013) e dentro dos fragmentos de mata semi-decídua, uma parte do dossel é  
2013 mantida durante os meses mais secos, diferentemente das Áreas 2 e 3, onde a maioria das  
2014 árvores perdem suas folhas durante a estação seca (florestas decíduas).

2015 Nas áreas de Cerrado, durante a estação seca, a umidade diminui até níveis muito  
2016 baixos e ambientes não caducifólios ou semi-decíduos podem manter microambientes  
2017 com menor perda hídrica. Esta característica pode favorecer a manutenção das espécies  
2018 de carrapatos encontradas neste estudo, visto que esses artrópodes são muito sensíveis à  
2019 dessecação (Needham e Teal, 1991), especialmente *Ixodes*, que foi encontrada  
2020 exclusivamente nesta área, e comumente ocorre em florestas úmidas, como mencionado  
2021 anteriormente. Por outro lado, a Área 3 apresentou apenas quatro espécies de pequenos  
2022 mamíferos, com apenas um dos marsupiais parasitados por *Ornithodoros*. Esta região tem  
2023 poucos fragmentos naturais imersos em uma matriz muito degradada e agrícola. Algumas  
2024 espécies de argasídeos podem suportar altas temperaturas e baixa umidade (Lees, 1947)  
2025 e este atributo pode favorecer sua ocorrência em áreas degradadas.

2026

## 2027 CONCLUSÃO

2028 Pequenos mamíferos são importantes hospedeiros para formas imaturas de carrapatos dos  
2029 gêneros *Ixodes* sp. e *Ornithodoros* sp., e para a espécie *Amblyomma dubitatum* em áreas

2030 de Cerrado com diferentes características de fragmentação, no vale do rio Paranaíba. O  
2031 carrapato da espécie *Amblyomma dubitatum* foi o de maior ocorrência em pequenos  
2032 mamíferos da região estudada, e este parece ser o primeiro registro desta espécie em  
2033 *Nectomys* sp. no bioma Cerrado. Esse é o primeiro registro de *Ixodes loricatus* parasitando  
2034 *Cerradomys* sp., e o primeiro registro de *Ixodes loricatus* em *Rhipidomys* sp. no Brasil.

2035

2036

2037

2038

2039

2040

2041

2042

2043

2044

2045

2046

2047

2048

2049

2050

2051

2052

2053

2054

## Referências

- Andren, H., 1994. Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportions of suitable habitat: a review. *Oikos*, 355-366.
- Agencia Nacional de Águas (ANA), 2013. Plano de Recursos Hídricos e do Enquadramento dos Corpos Hídricos Superficiais da Bacia Hidrográfica do Rio Paranaíba. 312p. ISBN: 978-85-8210-020-2
- Aragão HB. 1936. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*. 31, 759-841.
- Arzua, M., Da Silva, M.A.N., Famadas, K.M., Beati, L., Barros-Battesti, D.M., 2003. *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari: Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. *Experimental & Appl. Acarol*. 31, 283-296.
- Balashov, Y.S., 1972. Bloodsucking ticks (Ixodidae), vectors of disease of man and animals. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 8, 163-376.
- Barros-Battesti, D.M., Yoshinari, N.H., Bonoldi, V.L.N., de Castro Gomes, A., 2000. Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *I. loricatus* (Acari: Ixodidae) on small wild mammals from an Atlantic Forest in the State of São Paulo, Brazil. *J. Med. Entomology*. 37, 820-827.
- Bender, D.J., Contreras, T.A., Fahrig, L., 1998. Habitat loss and population decline: a meta-analysis of the patch size effect. *Ecology*. 79, 517-533.
- Bennett, A.F., 1990. Habitat corridors and the conservation of small mammals in a fragmented forest environment. *Landsc. Ecology*. 4, 109-122.
- Brooks, T.M., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A., Rylands, A.B., Konstant, W.R., Hilton-Taylor, C., 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation biology*. 16, 909-923.
- Brownstein, J.S., Holford, T.R., Fish, D., 2003. A climate-based model predicts the spatial distribution of the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in the United States. *Environ. Health Perspect.* 111, 1152-1157.
- Buchmann, C.M., Schurr, F.M., Nathan, R., Jeltsch, F., 2013. Habitat loss and fragmentation affecting mammal and bird communities - The role of interspecific competition and individual space use. *Ecological Informatics*. 14, 90-98.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The J. Parasitol.* 575-583.
- Cleaveland, S., Laurenson, M.K., Taylor, L.H., 2001. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos. Trans. R. Society B*. 356, 991-999.

- 2104 Cincotta, R. P., Wisnewski, J., Engelman, R. 2000. Human population in the biodiversity  
2105 hotspots. *Nat.*, 404, 990-992.  
2106
- 2107 Coelho, M.G., do Nascimento Ramos, V., Limongi, J.E., de Lemos, E.R.S., Guterres, A.,  
2108 da Costa Neto, S.F., Rozental, T., Bonvicino, C.R., D'Andrea, P.S., Moraes-Filho, J.,  
2109 Labruna, M.B., 2016. Serologic evidence of the exposure of small mammals to spotted-  
2110 fever *Rickettsia* and *Rickettsia bellii* in Minas Gerais, Brazil. *The J. Infect. Dev.*  
2111 *Ctries.* 10, 275-282.  
2112
- 2113 Dantas-Torres, F., Siqueira, D.B., Rameh-De-Albuquerque, L.C., Denisson Da Silva,  
2114 E.S., Zanotti, A.P., Ferreira, D.R., Martins, T.F., De Senna, M.B., Wagner, P.G.C., Da  
2115 Silva, M.A., Marvulo, M.F.V., Labruna, M.B., 2010. Ticks infesting wildlife species in  
2116 Northeastern Brazil with new host and locality records. *J. Med. Entomology.* 47, 1243-  
2117 1246.  
2118
- 2119 Debárbora, V.N., Mangold, A.J., Eberhardt, A., Guglielmone, A.A., Nava, S., 2014.  
2120 Natural infestation of *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Amblyomma dubitatum* ticks. *Exp.*  
2121 *Appl. Acarol.* 63, 285-294.  
2122
- 2123 Debárbora, V. N., Nava, S., Cirignoli, S., Guglielmone, A. A., & Poi, A. S. (2012). Ticks  
2124 (Acari: Ixodidae) parasitizing endemic and exotic wild mammals in the Esteros del Iberá  
2125 wetlands, Argentina. *Systematic and Applied Acarology*, 17(3), 243-250.  
2126
- 2127 Di´az, M.M., Nava, S., Guglielmone, A.A., 2009. The parasitism of *Ixodes luciae* (Acari:  
2128 Ixodidae) on marsupials and rodents in Peruvian Amazon. *Acta Amazon.* 39, 997–1002.  
2129
- 2130 Durden, L. A., & Keirans, J. E. (1994). Description of the larva, diagnosis of the nymph  
2131 and female based on scanning electron microscopy, hosts, and distribution of *Ixodes*  
2132 (*Ixodes*) *venezuelensis*. *Medical and veterinary entomology*, 8(4), 310-316.  
2133
- 2134 Fish, D., 1995. Environmental risk and prevention of Lyme disease. *The Am. J. Med.* 98,  
2135 2-8.  
2136
- 2137 Galvão, M.A.M., da Silva, L.J., Nascimento, E.M.M., Calic, S.B., Sousa, R., Bacellar, F.,  
2138 2005. Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurrence, distribution and diagnosis.  
2139 *Revista de Saúde Pública.* 39, 850-856.  
2140
- 2141 Guimarães, J.H., Tucci, E.C., Barros-Battesti, D.M., 2001. Ectoparasitos de importância  
2142 veterinária. Editora Plêiade São Paulo, Brasil.  
2143
- 2144 Johnstone, C.P., Lill, A., Reina, R.D., 2014. Habitat loss, fragmentation and degradation  
2145 effects on small mammals: Analysis with conditional inference tree statistical  
2146 modelling. *Biological Conserv.* 176, 80-98.  
2147
- 2148 Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitol.* 129, 3–14.  
2149
- 2150 Klink, C.A., MACHADO, R.B. 2005. A conservação do Cerrado brasileiro.  
2151 *Megadiversidade.* 1, 147-156.  
2152
- 2153 Köppen, W. 1948. Climatologia. México. Fundo de Cultura Econômica.

- 2154 Labruna, M.B., Kerber, C.E., Ferreira, F., Faccini, J.L.H., De Waal, D.T., Gennari, S.M.,  
2155 2001. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São  
2156 Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 97, 1-14.
- 2157  
2158 Labruna, M.B., Kasai, N., Ferreira, F., Faccini, J.L.H., Gennari, S.M., 2002. Seasonal  
2159 dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Vet.*  
2160 *Parasitol.* 105, 65-77.
- 2161  
2162 Labruna, M.B., Da Silva, M.J.N., De Oliveira, M.D.F., Barros-Battesti, D.M., Keirans,  
2163 J.E., 2003. New records and laboratory-rearing data for *Ixodes schulzei* (Acari: Ixodidae)  
2164 in Brazil. *J. Med. Entomol.* 40, 116-118.
- 2165  
2166 Labruna, M.B., 2008. *Ixodologia brasileira: revisão histórica e determinação de*  
2167 *hospedeiros primários*. Livre-docência. University of São Paulo, Brazil, pp. 75.
- 2168  
2169 Lees, A.D. 1947. Transpiration and structure of the epicuticle in ticks. *The J. Exp.*  
2170 *Biology.* 23, 379-410.
- 2171  
2172 Lamattina, D., Venzal, J.M., Costa, S.A., Arrabal, J.P., Flores, S., Berrozpe, P.E.,  
2173 González-Acuña, D., Guglielmone, A.A., Nava, S. 2018. Ecological Characterization of  
2174 a Tick Community Across a Landscape Gradient Exhibiting Differential Anthropogenic  
2175 Disturbance in the Atlantic Forest Ecoregion in Argentina. *The Royal Entomological*  
2176 *Society*. DOI: 10.1111/mve.12295
- 2177  
2178 Limongi, J.E., Oliveira, R.C., Guterres, A., Neto, S.C., Fernandes, J., Vicente, L.H.B.,  
2179 Coelho, M.G., Ramos, V.N., Ferreira, M.S., Bonvicino, C.R., D'Andrea, P.S., 2016.  
2180 Hantavirus pulmonary syndrome and rodent reservoirs in the savanna-like biome of  
2181 Brazil's southeastern region. *Epidemiology Infect.* 144, 1107-1116.
- 2182  
2183 LoGiudice K, RS Ostfeld, KA Schmidt, F Keesing. 2003. The ecology of infectious  
2184 disease: Effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk.  
2185 *Proceedings Natl. Acad. Sci.* 100, 567-571.
- 2186  
2187 Luz, H.R., Faccini, J.L.H., Landulfo, G.A., Sampaio, J.D.S., Neto, C., Fraga, S., Barros-  
2188 Battesti, D.M., 2013. New host records of *Ixodes luciae* (Acari: Ixodidae) in the State of  
2189 Para, Brazil. *Revista Bras. Parasitol. Vet.* 22, 152-154.
- 2190  
2191 Martins, T.F., Onofrio, V.C., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., 2010. Nymphs of the  
2192 genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and  
2193 identification key. *Ticks Tick-borne Dis.* 1, 75-99.
- 2194  
2195 Martins, T.F., Venzal, J.M., Terassini, F.A., Costa, F.B., Marcili, A., Camargo, L.M.A.,  
2196 Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B. 2014. New tick records from the state of Rondônia,  
2197 western Amazon, Brazil. *Exp Appl Acarol.* 62, 121–128.
- 2198  
2199 Mittermeier, R.A., Myers, N., Mittermeier, C.G., Robles Gil, P. 1999. Hotspots: Earth's  
2200 biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX, SA,  
2201 Agrupación Sierra Madre, SC.
- 2202

- 2203 Muñoz-Leal, S., Eriksson, A., Santos, C.F., Fischer, E., de Almeida, J.C., Luz, H.R.,  
2204 Labruna, M.B. 2016. Ticks infesting bats (Mammalia: Chiroptera) in the Brazilian  
2205 Pantanal. *Exp. Appl. Acarol.* 69, 73-85.
- 2206  
2207 Nava, S., Venzal, J.M., Labruna, M.B., Mastropaolo, M., González, E.M., Mangold, A.  
2208 J., Guglielmone, A.A., 2010. Hosts, distribution and genetic divergence (16S rDNA) of  
2209 *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 51, 335-351.
- 2210  
2211 Needham GR, Teal PD. 1991. Off-host physiological ecology of ixodid ticks. *Annual*  
2212 *Review of Entomology*, 36: 659-651.
- 2213  
2214 Oliveira-Filho, A.T., Ratter, J.A., 2002. Vegetation physiognomies and woody flora of  
2215 the Cerrado biome. *The Cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a Neotropical*  
2216 *savanna*, pp. 91-120.
- 2217  
2218 Oliveira, P.R., Borges, L.M.F., Lopes, C.M.L., Leite, R.C. 2000. Population dynamics of  
2219 the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae) on  
2220 pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 92, 295-301.
- 2221  
2222 Onofrio, V.C., Labruna, M.B., Pinter, A., Giacomini, F.G., Barros-Battesti, D.M., 2006.  
2223 Comentários e chaves para as espécies do gênero *Amblyomma*, in: Barros-Battesti, D.M.,  
2224 Arzua, M., Bechara, G. Carrapatos de importância médica veterinária da região  
2225 neotropical. Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Butantan, Brazil,  
2226 pp. 53-113.
- 2227  
2228 Onofrio, V.C., Nieri-Bastos, F.A., Sampaio, J.D.S., Soares, J.F., Silva, M.J.D.J., Barros-  
2229 Battesti, D.M., 2013. Noteworthy records of *Ixodes schulzei* (Acari: Ixodidae) on rodents  
2230 from the State of Parana, southern Brazil. *Revista Bras. Parasitol. Vet.* 22, 159-161.
- 2231  
2232 Ostfeld, R.S., Keesing, F., 2000. Biodiversity and disease risk: the case of Lyme disease.  
2233 *Conserv. biology.* 14, 722-728.
- 2234  
2235 Pascoli, G.V.T., 2014. Carrapatos e riquetsias em parque urbano de Uberlândia, Minas  
2236 Gerais: ecologia e biodiversidade associadas. (Doctoral dissertation, Federal University  
2237 of Uberlândia, Brazil).
- 2238  
2239 Prusinski, M.A., Chen, H., Drobnack, J.M., Kogut, S.J., 2006. Habitat structure  
2240 associated with *Borrelia burgdorferi* prevalence in small mammals in New York State.  
2241 *Environ. Entomol.* 35, 308-319.
- 2242  
2243 Queirogas, V.L., Del Claro, K., Nascimento, A.R.T., Szabó, M.P.J., 2012. Capybaras and  
2244 ticks in the urban areas of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil: ecological aspects for the  
2245 epidemiology of tick-borne diseases. *Exp. Appl. Acarol.* 57, 75-82.
- 2246  
2247 Ramirez, D. G., 2017. Pesquisa de agentes infecciosos associados aos carrapatos de  
2248 pequenos mamíferos, em área de Mata Atlântica no município de Cotia, São Paulo  
2249 (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- 2250  
2251 Ramos, V.N., 2013. Ecologia da interação entre carrapatos e hospedeiros no pantanal: o  
2252 papel do porco monteiro, do gado nelore e de pequenos mamíferos para a ixodofauna na

- 2253 sub-região da Nhecolândia, MS (Doctoral dissertation, Federal University of Uberlândia,  
2254 Brazil).
- 2255
- 2256 Ramos, V.N., Piovezan, U., Franco, A.H.A., Rodrigues, V.S., Nava, S., Szabó, M.P.,  
2257 2016. Nellore cattle (*Bos indicus*) and ticks within the Brazilian Pantanal: ecological  
2258 relationships. *Exp. Appl. Acarol.* 68, 227-240.
- 2259
- 2260 Ratter, J.A., Ribeiro, J.F., Bridgewater, S. 1997. The Brazilian Cerrado vegetation and  
2261 threats to its biodiversity. *Ann. Bot.* 80(3), 223-230.
- 2262
- 2263 Reiczigel, J., Rózsa, L., 2005. *Quantitative Parasitology 3.0*. Budapest. Distributed by  
2264 the authors.
- 2265
- 2266 Rocha, C.R., 2011. *Dinâmica populacional de roedores de um Cerrado do Brasil*  
2267 *central* (Doctoral dissertation, University of Brasília, Brazil).
- 2268
- 2269 Sangioni, L.A., Horta, M.C., Vianna, M.C., Gennari, S.M., Soares, R.M., Galvão, M.A.,  
2270 Schumaker, T.T., Ferreira, F., Vidotto, O., Labruna, M. B., 2005. Rickettsial infection in  
2271 animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis.* 11, 265-270.
- 2272
- 2273 Saraiva, D., Fournier, G.D.S.R., de Oliveira, S.P., Ogrzewalska, M., Camara, E.M.V.C.,  
2274 Costa, C.G., Botelho, J.R., 2012a. Ectoparasites from small mammals from the Cerrado  
2275 region in the Minas Gerais state, Brazil. *Res. J. Costa Rican Distance Educ. Univ.* 4, 1.
- 2276
- 2277 Saraiva, D.G., Fournier, G.F., Martins, T.F., Leal, K.P., Vieira, F.N., Câmara, E.M.,  
2278 Labruna, M.B., 2012b. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with small terrestrial mammals  
2279 in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. *Exp. Appl. Acarol.* 58, 159-166.
- 2280
- 2281 Schlinkert, H., Ludwig, M., Batáry, P., Holzschuh, A., Kovács-Hostyánszki, A.,  
2282 Tschamntke, T., Fischer, C., 2016. Forest specialist and generalist small mammals in forest  
2283 edges and hedges. *Wildl. Biology.* 22, 86-94.
- 2284
- 2285 Silva, F.J 2014. *Epidemiologia da infecção por Leptospira spp. em áreas rurais nos*  
2286 *biomas brasileiros*. (Doctoral Dissertation, Universidade Estadual Paulista, Brasil) 121p.
- 2287
- 2288 Sonenshine, D.E., Nicholson, W.L., Lane, R.S., 2002. Ticks (Ixodidae), in: Mullen, G.,  
2289 Durden, L. (Eds.), *Med. Vet. Entomol.* Acad. Press. London, 517–558.
- 2290
- 2291 Sponchiado, J., Melo, G.L., Martins, T.F., Krawczak, F.S., Labruna, M.B., Cáceres, N.C.,  
2292 2015. Association patterns of ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae, Argasidae) of small  
2293 mammals in Cerrado fragments, western Brazil. *Exp. Appl. Acarol.* 65, 389-401.
- 2294
- 2295 Szabó, M.P.J., Castro, M.B., Ramos, H.G.C., Garcia, M.V., Castagnolli, K.C., Pinter, A.,  
2296 Labruna, M.B., 2007. Species diversity and seasonality of free-living ticks (Acari:  
2297 Ixodidae) in the natural habitat of wild Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in  
2298 Southeastern Brazil. *Vet. Parasitol.* 143, 147-154.
- 2299
- 2300 Szabó, M.P.J., Pinter, A., Labruna M.B., 2013. Ecology, biology and distribution of  
2301 spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 27.
- 2302



Thorner, A.R., Walker, D.H., Petri Jr, W.A., 1998. Rocky Mountain spotted fever. Clin. Infect. Dis. 27, 1353-1359.

Vieira, M.V., 1997. Dynamics of a rodent assemblage in a Cerrado of southeast Brazil. Revista Bras. Biologia. 57, 99-107.

Wimberly, M.C., Yabsley, M.J., Baer, A.D., Dugan, V.G., Davidson, W.R., 2008. Spatial heterogeneity of climate and land-cover constraints on distributions of tick-borne pathogens. Glob. Ecol. Biogeogr. 17, 189-202.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As propriedades rurais no Brasil, em sua maioria, não apresentam grande emprego de tecnologia em seus sistemas de produção, principalmente na atividade pecuária. Geralmente não possuem assessoria medico-veterinária de forma contínua, e gerenciam suas empresas de modo empírico e intuitivo. Muitas das vezes os proprietários se organizam a partir de demandas dos órgãos regulatórios e fiscalizadores do estado, para conseguirem assegurar a comercialização de seus produtos.

A leptospirose é uma importante zoonose, porém não é uma doença de controle oficial em animais, junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) brasileiro, nem aos órgãos estaduais de defesa sanitária animal. É uma bacteriose de curso crônico em bovinos, causando principalmente prejuízos imperceptíveis àquelas propriedades que não praticam controle zootécnico, com emprego adequado de tecnologia. Por isso, muita das vezes a leptospirose em criações extensivas é negligenciada pelo proprietário, e até mesmos pelos profissionais médicos veterinários.

*Leptospira* spp. é uma bactéria mantida no ambiente pelos animais portadores renais, muita das vezes assintomáticos. Infecta uma grande série de espécies domésticas e selvagens, e já foi descrito o diagnóstico, por técnicas diretas e indiretas, nos mamíferos, peixes, aves e répteis. Geralmente, ao se suspeitar da ocorrência desta doença em uma propriedade, a preocupação técnica se recai sobre a principal espécie comercial ali existente, e não se dá a importância devida ao ambiente, e às espécies comunicantes que possibilitam a manutenção das leptospirosas viáveis para a infecção e reinfecção.

Pequenos mamíferos não voadores são um grupo de espécies que podem apresentar crescimento de suas populações em ambientes onde se tenha algum grau de antropização. Assim eles se tornam uma boa ferramenta para identificação de patógenos, e para estudo da intensidade de circulação dos mesmos no ambiente. Os bovinos são uma

2379 espécie comercial que apresenta um maior contato com ambientes onde não se consegue  
2380 restringir a presença de outras espécies domésticas, sinantrópicas e selvagens. Esses  
2381 ruminantes também apresentam grande densidade no território brasileiro, e é de  
2382 fundamental importância econômica na bacia do rio Paranaíba.

2383       Devido a isso, desenhou-se este estudo na tentativa de compreender melhor a  
2384 relação entre espécies coabitantes, na manutenção e circulação de leptospiros patogênicos,  
2385 por meio dos bovinos e pequenos mamíferos, bem como tentar identificar quais espécies,  
2386 genótipos e sorovares mais comuns à região do vale do rio Paranaíba.

2387       Para isso o projeto incluía a captura de pequenos mamíferos no vale do rio  
2388 Paranaíba, buscando por métodos sorológicos, moleculares e por isolamento, identificar  
2389 quais tipos de leptospiros circulavam entre esses animais. Outra frente de pesquisa foi o  
2390 estudo sorológico e tentativa de isolamento a partir de urina de 385 bovinos distribuídos  
2391 em 74 diferentes propriedades, ao longo de 20 municípios banhados pelo rio Paranaíba.  
2392 Por conta da heterogeneidade edafoclimática e de características dos rebanhos desta  
2393 região, resolveu-se por dividi-la em três áreas distintas: Alto, Médio e Baixo Paranaíba.

2394       Entretanto, no decorrer da execução do projeto, nem todos os objetivos foram  
2395 alcançados. Devido à realidade política, econômica e social a que o Brasil tem sido  
2396 submetido aos últimos anos, grandes dificuldades no custeio de material de consumo  
2397 foram encontradas. Logo, despesas como enriquecimento para meio de cultura,  
2398 antibióticos para meios seletivos, seringas, agulhas, bisturi, formol, álcool, sacos para  
2399 contenção, tubos “falcon”, coletores universais, anestésicos, insumos para extração de  
2400 DNA e execução da PCR, hospedagens, deslocamento, manutenção de veículo,  
2401 combustível, alimentação, entre outros, correram por conta do doutorando.

2402 Apesar de todas as dificuldades, importantíssimos acordos de cooperação  
2403 puderam ser feitos, com o Laboratório de Ixodologia da Universidade Federal de  
2404 Uberlândia, Departamento de Zoologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de  
2405 Queiroz, Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense  
2406 e Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas. Com todo  
2407 esse apoio, juntamente com o suporte oferecido pela robusta e eficiente estrutura do  
2408 Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da  
2409 Universidade Federal de Uberlândia, a que esse projeto está vinculado, a realização desta  
2410 tese foi viabilizada.

2411 E assim conseguiu-se realizar seis campanhas de capturas de pequenos mamíferos,  
2412 em três áreas distintas do vale do rio Paranaíba, num total de 576 horas/armadilhas.  
2413 Executar os diagnósticos sorológicos e de PCR para leptospiros patogênicos em 72  
2414 pequenos mamíferos, coletar e identificar ácaros que os parasitavam, e proceder a  
2415 identificação de suas espécies. Tecido renal destes animais se encontram emblocados em  
2416 parafina e prontos para finalizar o diagnóstico por imunofluorescência, entretanto ainda  
2417 se necessita dos anticorpos primários e secundário para essa reação.

2418 Em relação à temática dos bovinos, conseguiu-se visitar 16 propriedades em dois  
2419 municípios da região do Alto Paranaíba, oito propriedades em quatro municípios do  
2420 Médio Paranaíba, 16 propriedades em cinco municípios do Baixo Paranaíba. Frente a esse  
2421 esforço, coletou-se amostras de 220 bovinos nos estados de Minas Gerais, Goiás e Mato  
2422 Grosso do Sul, e já se executou suas sorologias.

2423 Quanto às tentativas de isolamento de *Leptospira* spp., não se obteve sucesso a  
2424 partir de amostras de urina e tecido renal dos pequenos mamíferos. Mas para bovinos,  
2425 conseguiu-se isolar duas colônias de bactérias com morfologia semelhante à de  
2426 leptospiros. As sementes dessas culturas se encontram congeladas em nitrogênio líquido,

2427 e ainda necessitam passar por reativação, e caso se confirme se tratar de *Leptospira* spp.,  
2428 realizar a identificação genotípica e sorológica dessas estirpes.

2429       Em sequência a este trabalho, vê-se a necessidade de isolamento de estirpes de  
2430 leptospiros circulantes na região do vale do rio Paranaíba, e de sua identificação  
2431 genotípica e sorológica. Isolamento esse, que deve ocorrer tanto a partir de estruturas do  
2432 ambiente (água e solo), como também a partir de animais de produção, sinantrópicos,  
2433 selvagens, como também de humanos. Justamente para se criar um melhor entendimento  
2434 da ecoepidemiologia desta doença, verificar as espécies de hospedeiros e suas estirpes de  
2435 manutenção. Além de buscar definir, avaliar, analisar e compreender riscos zoonóticos  
2436 os mecanismos de transmissão da leptospirose na região do vale do Paranaíba. Assim,  
2437 buscando desenvolver alternativas para diminuição do risco de infecção e reinfecção dos  
2438 hospedeiros susceptíveis, o que culmina numa maior contaminação do ambiente, e  
2439 consequentemente um maior desafio aos animais e aos humanos.

2440       O isolamento de estirpes circulantes também se faz necessário para a geração de  
2441 uma bateria de antígenos regionalizada, a fim de aumentar a sensibilidade do diagnóstico  
2442 sorológico (MAT). Outra conveniência da criação desta coleção regional, é para a  
2443 confecção de bacterinas que venham realmente conferir proteção aos animais contra a  
2444 leptospirose, já que a imunidade é gerada somente contra cada sorovar, não havendo  
2445 reação cruzada entre eles.

2446       Esses fatores implicam na adoção de algumas medidas preventivas: O  
2447 reconhecimento de pequenos mamíferos não voadores como importantes vias de  
2448 manutenção e circulação de leptospiros patogênicos no ambiente; A identificação da  
2449 possibilidade de infecção de animais de produção a partir do consumo de água em rios e  
2450 riachos, e com o contato com o solo nas margens desses cursos d'água; O reconhecimento  
2451 do risco de infecção pelo contato com o solo no interior de matas ribeirinhas, decíduais e

2452 semideciduais. Por isso indica-se o fornecimento somente de água tratada (cloração) aos  
2453 animais de produção, e sugere-se que as áreas de matas sejam cercadas, no intuito de  
2454 impedir o acesso de animais de produção, visando tanto a prevenção da infecção por  
2455 *Leptospira* spp. nesses animais, como também a diminuição do efeito de borda em  
2456 fragmentos de matas, e do pisoteio de margens de rios e nascentes.

2457       As áreas de ecótono são caracterizadas por uma maior riqueza de espécies, por se  
2458 tratarem de uma região de transição entre dois diferentes biomas. Logo são áreas  
2459 importantes para o monitoramento de mudanças naturais, ou interferências antrópicas, de  
2460 impacto regional ou mesmo global, como as mudanças no clima. Ecótono são áreas  
2461 dinâmicas que, com o tempo, podem mudar de largura e até de posição, em razão de  
2462 mudanças ambientais. Dado a este dinamismo, por serem regiões sensíveis a mudanças  
2463 são, portanto, considerados como importantes indicadores.

2464       Visto isso, a vigilância epidemiológica de hospedeiros, do ambiente, dos vetores  
2465 e patógenos circulantes nessas áreas de ecótono do vale do rio Paranaíba, é imprescindível  
2466 para a geração de um banco de dados que venha possibilitar o entendimento da relação  
2467 da tríade epidemiológica nesta área. Desta forma possibilitando a análise dos riscos, e a  
2468 previsão de eventos epidêmicos, ou mesmo de surtos, a partir de alterações que venham  
2469 a ocorrer neste ambiente, sejam elas naturais ou de natureza antrópica. Essas informações  
2470 também são necessárias para o desenvolvimento de ações profiláticas para a leptospirose,  
2471 e consequentemente, para a prevenção e diminuição de prejuízos à saúde pública e à  
2472 produção animal. Portanto, trabalhos eco-epidemiológicos contínuos sobre a circulação  
2473 de vetores e patógenos, utilizando ferramentas sorológicas, moleculares, de cultura e  
2474 isolamento, são necessários no vale do rio Paranaíba.

2475       A experiência de vivenciar a realidade de propriedades rurais, entre os 1000 km  
2476 de extensão do rio Paranaíba, desde sua nascente na Serra da Mata da Corda até sua foz

no rio Grande, fronteira ao extremo oeste do Triângulo Mineiro, possibilitaram o conhecimento *in locu* das condições de produção de pequenas, médias e grandes propriedades rurais. Foi possível conhecer o impacto social, ambiental e econômico das atividades agropecuárias características de cada região. Como a influência das pequenas propriedades leiteiras na região do Alto Paranaíba, mantenedoras do Patrimônio Cultural Imaterial Brasileiro: o queijo. Que a partir do controle de origem deste produto (Canastra, Serra do Salitre, Região do Cerrado, Pratinha, entre outros) mantiveram boa parte da população rural no campo, reforçou-se a tradição desta manufatura, adequou a produção a padrões higiênico-sanitários internacionais, manteve a circulação local da renda, e possibilitou a oferta de um produto de qualidade ao consumo humano. E segundo dados da Agencia Nacional de Águas, é nessa parte da bacia do rio Paranaíba que se tem o maior índice de preservação das vegetações naturais de Mata Atlântica e Cerrado.

Na região do Médio Paranaíba foi possível reconhecer um ambiente misto de produção, com propriedades de pequenas a médias, associando gado de corte e gado leiteiro, porém com produtividade menor, e menor emprego de tecnologia. E o Baixo Paranaíba, que passa por um processo de substituição da bovinocultura pela cultura da cana-de-açúcar. Fato tão lamentado pelos antigos agricultores e pecuaristas, na maioria pequenos proprietários, que confessaram a necessidade de arrendar suas terras para as usinas de açúcar e álcool. E em consequência dessa substituição da atividade produtiva, relataram a forte diminuição da circulação local da renda, afetando os setores de comércio e serviços, e consequentemente a qualidade do emprego e da renda das famílias. Desta forma, algumas delas foram obrigadas a migrar do campo para as cidades, e das pequenas cidades para aquelas maiores. Como relataram os produtores de Itaguaçu, distrito do município de São Simão, no estado de Goiás, e de Ipiacu em Minas Gerais.

2501           Considerando que o ponto de equilíbrio de atividades bovinocultoras só pode ser  
2502 alcançado pelo aumento da receita bruta, ou pela diminuição dos custos de produção, as  
2503 propriedades voltadas à bovinocultura de corte precisam ser localizadas em áreas de terras  
2504 mais baratas (diminuição do valor imobilizado em terra) e com a maior produção e  
2505 produtividade possível, dado a pequena margem de lucro por unidade comercializada.  
2506 Desta forma, nos municípios de Caçu (GO), Itarumã (GO) e Paranaíba (MS),  
2507 caracterizados por suas grandes extensões territoriais e menor valor comercial do hectare,  
2508 foi possível observar um maior número de grandes propriedades rurais voltadas à  
2509 bovinocultura de corte, com maior emprego de tecnologia, e com um controle financeiro  
2510 mais rigoroso.

2511           Em suma, pôde-se perceber que em regiões onde se teve uma melhor assessoria  
2512 profissional, com o adequado emprego de tecnologia, principalmente aos pequenos  
2513 produtores rurais, os prejuízos sociais, ambientais e econômicos foram menores.  
2514 Principalmente se houve emprego de políticas públicas para o favorecimento da  
2515 comercialização de produtos a partir das pequenas propriedades.

2516           Logo, verifica-se a necessidade de uma maior interação do meio acadêmico com  
2517 os setores produtivos rurais e da valorização do homem do campo, tendo em vista a  
2518 difusão do conhecimento já produzido pelas instituições de ensino e pesquisa do Brasil,  
2519 como também para o reconhecimento das demandas geradas por essas atividades  
2520 econômicas. Assim, tornando possível a produção de novas tecnologias e alternativas  
2521 para mitigação de problemas já existentes, buscando alcançar maior justiça social,  
2522 garantindo a vocação e a produtividade dos diferentes sistemas de produção agrícola e  
2523 pecuário de cada região, não deixando de conferir segurança alimentar para a população.