

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
PATOGÊNICAS 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 leptospiras patogênicas e carapatos
/ 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

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



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 N° 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 PATOGÊNICAS 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 50 – 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 mecenás 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 Guimarânia 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 leptospiras 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*, *Necromys* 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 leptospiras 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 leptospiras 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 registo de *Ixodes loricatus* parasitando *Cerradomys* sp. e *Ixodes loricatus* em *Rhipidomys* sp. no Brasil.

Palavras-chave: Ecologia; *Gracilinanus agilis*; *lipL32*; Ecótono; *Amblyoma 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 leptospirosis. 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*, *Necromys* 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 leptospires 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 leptospires. 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 dubtatum*

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR do gene <i>lipL32</i> de Leptospiras patogênicas e reagentes ao MAT em suas respectivas áreas de captura, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.	51
Tabela 2.	Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR do gene <i>lipL32</i> de Leptospiras patogênicas em suas respectivas áreas e ambientes de captura, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.	53
Tabela 3.	Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR do gene <i>lipL32</i> de Leptospiras patogênicas em seus respectivos locais de instalação da armadilha, e estação do ano. Vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.	58
Tabela 4.	Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR do gene <i>lipL32</i> de Leptospiras patogênicas e ao MAT, em suas respectivas categorias sexual e etária, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.	59
Tabela 5.	Sucesso de captura de pequenos mamíferos não voadores em suas respectivas áreas e ambientes de captura, vale do rio Paranaíba, Brasil, 2016.	60
Quadro 1.	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

Tabela 1.	Frequência de bovinos reagentes ao MAT para leptospirose e suas respectivas categorias etária e sexual, Goiandira – GO, 2016.	89
Tabela 2.	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
Tabela 3.	Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR de tecido renal para o gene <i>lipL32</i> de leptospiras patogênicas em seus respectivos ambientes de captura, local de instalação de armadilhas e mês de captura. Fazenda Mata da Fartura, Goiandira – GO, 2016.	94
Quadro 1.	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

Tabela 1.	Parâmetros de infestação para carapatos 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 Ipiaçu-MG (Baixo Paranaíba), Goiandira-GO (Médio Paranaíba) e Guimaránia-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

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

CAPÍTULO 4

- 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. 117
- Figura 2.** 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 Guimaraçá-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 Carapatos 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 leptospiras patogênicas no vale do rio Paranaíba, Brasil	36
CAPÍTULO 3 – Papel dos pequenos mamíferos não voadores na manutenção e veiculação de leptospiras patogênicas em rebanho bovino com leptospirose	76
CAPÍTULO 4 –Carapatos 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 à 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 leptospiras 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 à 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; LUCCHESE et al., 2016; CORREIA; LOUREIRO; LILENBAUM, 2017).

Leptospiras 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; GIRONS 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 epítocos superficiais em um mosaico de抗ígenos lipopolissacarídeos (LPS), enquanto a especificidade dos epítocos depende da sua composição e conformação dos açúcares. De acordo com Faine et al. (1999) as leptospires 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 Wolffi (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 freqüentes: Hardjo (amostra Norma), 23,7%, Hardjo (OMS), 19,7%, Hardjo (Hardjobovis), 13,8%, e Wolffi, 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 leptospiras dependem de condições especiais no meio ambiente para que se mantenham vivas, como umidade e pH neutro à levemente alcalino, podendo, porém sobrevivem 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 accidental em humanos é maior. Ambientes favoráveis para a sobrevivência de leptospiras 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 leptospiras no ambiente. A transmissão sexual também é importante nessas espécies. Em teoria, qualquer leptospira 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 leptospiras 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 roedoressistemas 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 leptospiras 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 mantém 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 leptospiras patogênicas 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 leptospiras, 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 leptospiras remanescente à essa primeira fase, e esses animais começam a eliminar leptospiras, 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 leptospiras 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 leptospiras 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 cercanía 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 sorogruo 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 leptospires do mesmo sorogruo 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 coaglutinações. Sendo assim, muitas vezes podem ocorrer títulos similares para todos os sorovares de um mesmo sorogruo (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, líquor e vários órgãos *pós-mortem* (LEVETT, 2014). Já foram descritos ensaios de PCR quantitativos com inúmeros genes alvo, entre eles o *lipL32*, próprio de leptospires

patogênicas (MERIEN et al., 2005; PALANIAPPAN et al., 2005; AHMED et al., 2009; STODDARD et al., 2009). Outros genes comuns à leptospiras 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 leptospiras requerem meios especializados para o isolamento, são de difícil recuperação, o que diminui a sensibilidade deste método diagnóstico direto. É possível recuperar leptospiras a partir do sangue de animais em fase de leptospiremia e, principalmente, de urina e tecido renal de animais na fase crônica de leptosiúria. 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 leptospiras, 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 leptospiras 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-BATTTESTI, 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 km², 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 km² (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 leptospiras (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 carapatos (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 leptospiras 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 carapatos (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 leptospiras, e parasitismo por carapato 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 carapatos e patógenos, por serem importantes mantenedores de fases imaturas de carapatos (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 leptospiras 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 leptospiras 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 leptospires 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.; RICALDI, 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 leptospirosis 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 Veterinaria 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.; HARTSKERL, 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.; QUEIRROZ, 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-BATTTESTI, 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 Veterinaria 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; VEREJKEN, 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.

LUCCHESE, L.; BENKIRANE, A.; HAKIMI, I.; IDRISI, 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 Goias/Brazil. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 607–617, 2010.

MATTHIAS, M. A; RICALDI, 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: Ciencias Agrarias**, 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 São 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.; MCCAUSTRALAND, 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; LOPEZ, 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 leptospiras patogênicas no vale do rio Paranaíba, Brasil.

Marsupiais e roedores portadores renais de leptospiras patogênicas no vale do rio Paranaíba, Brasil.

3

4 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 leptospiras 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 leptospiras 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 leptospiras patogênicas.

26

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

28

29 1. Introdução

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

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

38 O bioma Cerrado é o segundo maior do Brasil, cobrindo originalmente cerca de 2
39 milhões de km², o que corresponde a 23% do território do país (Ratter et al., 1997). Mais
40 da metade de sua área original tornou-se pastagens e culturas anuais nos últimos 35 anos,
41 restando apenas 20% de sua área original (Brooks et al., 2002). Isso chama a atenção para
42 um contato cada vez mais íntimo entre os animais de produção, roedores sinantrópicos,
43 humanos, e as espécies de pequenos mamíferos não voadores selvagens. Assim, o fluxo
44 de *Leptospira* spp. no ambiente rural pode ser veiculado pelos pequenos mamíferos não
45 voadores selvagens, como também pelos roedores sinantrópicos, animais de produção e
46 de trabalho, aumentando o risco ocupacional da leptospirose para humanos (Akande,
47 2011; Backhans et al., 2013; Miller et al., 2013; Silva, 2014).

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

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

59 Pequenos mamíferos não voadores são animais que podem responder à fragmentação
60 de modo diverso a outros grupos, com aumento de riqueza e abundância de espécies
61 (Pardini, 2004), e a proliferação destas espécies selvagens oportunistas e generalistas, por
62 sua vez favorecem a proliferação e dispersão de patógenos no ambiente (Daszak et al.,
63 2004; Primack e Rodrigues, 2001). Roedores são os principais reservatórios de
64 leptospiras nos meios urbano, rural e selvagens. Os marsupiais dividem seu ambiente de
65 vida com os roedores, desta forma são continuamente desafiados, e se infectam por
66 contato indireto com este ambiente contaminado. Sendo assim, se tornam importantes na
67 epidemiologia da leptospirose (Fornazari et al., 2018).

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

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

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

86

87 **2. Material e métodos**

88 **2.1. Área de estudo**

89 O estudo foi conduzido em três áreas ao longo do vale do rio Paranaíba (Figura 1). A
90 primeira área de coleta localiza-se no município de Ipiaçu, estado de Minas Gerais,
91 classificado como região do Baixo Paranaíba (18,7770833S; 49,8978889W); a segunda
92 área situa-se no município de Goiandira, Goiás, a representar o Médio Paranaíba
93 (18,1630556S; 48,1354722W); e a terceira área situa-se no município de Guimaránia,
94 Minas Gerais, no Alto Paranaíba (18,8101944S; 46,6755278W).

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

106

107 **2.2. Ambientes de captura de pequenos mamíferos**

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

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

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

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

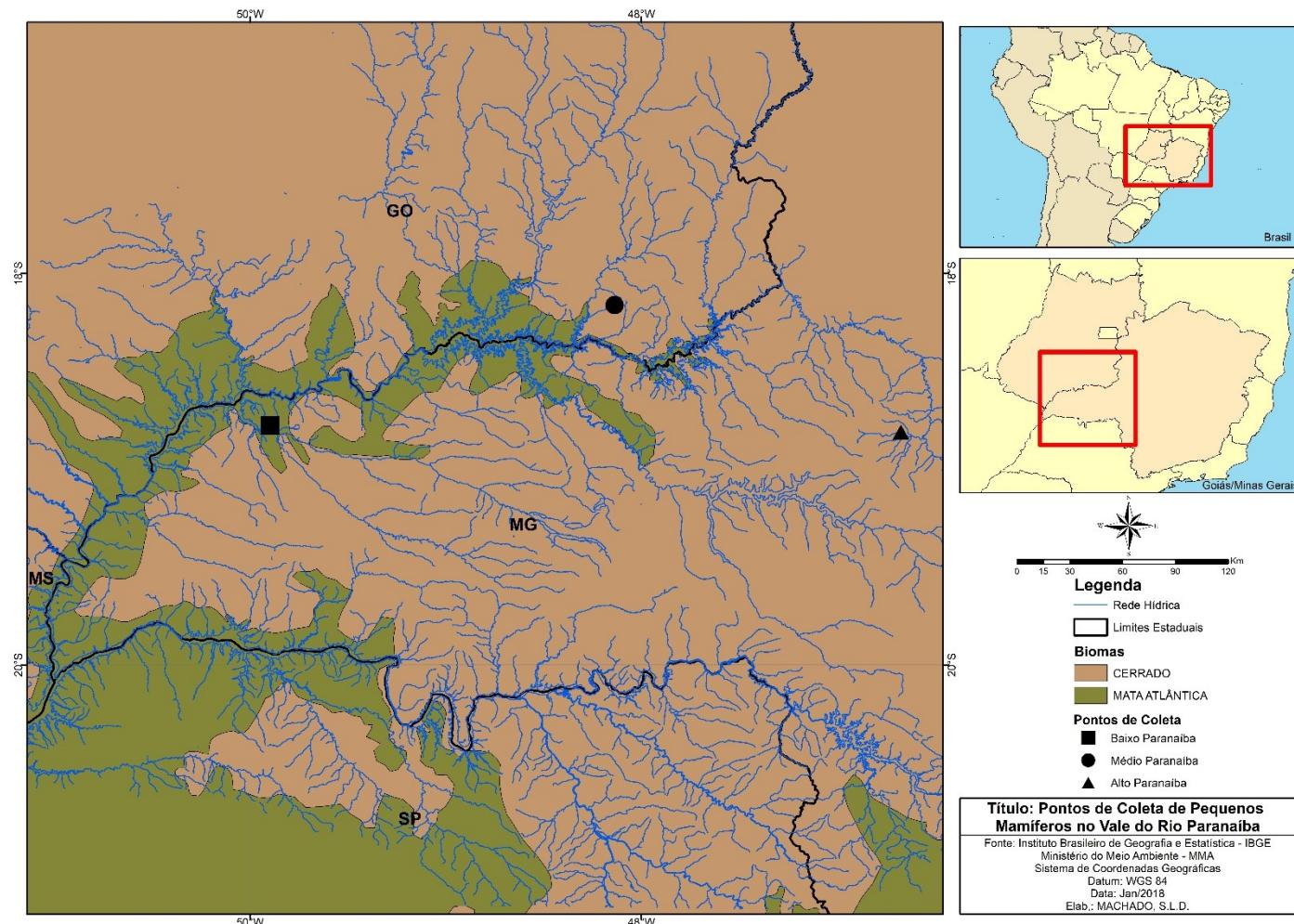
119 4. Pasto sujo: Considerou-se pasto sujo a área utilizada para pastoreio do
120 gado, com predomínio do capim *Brachiaria decumbens* em sua altura máxima de
121 crescimento. O pasto amostrado é margeado por alguma das matas já descritas e utilizadas
122 para coleta de pequenos mamíferos não voadores.

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

130

131 **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.

142



143

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

146

147

148

149 **2.4. Captura de pequenos mamíferos**

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

154 Foram utilizadas armadilhas dos tipos *Sherman* e *Tomahawk*, iscadas com rodelas de
155 banana cobertas por farelo de paçoca (Ramos, 2013; Limongi et al., 2016; Ramirez,
156 2017). Nos ambientes antrópicos, foram utilizadas, em média, oito armadilhas tipo
157 *Sherman* colocadas em variados pontos considerados propícios. Para os ambientes de
158 mata decidual e semidecidual, assim como matas ribeirinhas, 50 armadilhas tipo *Sherman*
159 foram montadas em cada uma das duas fisionomias, dispostas em linhas com estações de
160 captura a cada dez metros, em que uma armadilha era instalada sobre o solo e outra sobre
161 uma árvore em cada estação. No ambiente de pasto sujo, oito armadilhas tipo *Tomahawk*,
162 e oito tipos *Sherman* foram colocadas linearmente sobre o solo a cada dez metros. Todas
163 as armadilhas foram inspecionadas diariamente pela manhã, tendo a isca trocada a cada
164 48 horas ou reposta quando necessário.

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

172

173

174 **2.5. Coleta de Material Biológico**

175 Os animais não eutanasiados foram submetidos apenas à punção sanguínea pela veia
176 lateral da cauda (Lee e Goosens, 2015). Nos animais eutanasiados, a coleta de sangue foi
177 feita pelo método da exsanguinação intracardíaca (CFMV, 2013; CONCEA, 2013; Silva,
178 2014). As amostras de sangue foram armazenadas em microtubos até a retração do
179 coágulo, e posteriormente fez-se a separação do soro sanguíneo. As amostras de soro
180 foram devidamente identificadas e armazenadas a -20 °C.

181 Também nos espécimes eutanasiados, fez-se uma incisão abdominal para retirada dos
182 rins. Em seguida, tão logo retirou-se o órgão, próximo a um bico de Bunsen com chama
183 azul, por meio de bisturi esterilizado, um rim de cada espécime foi recortado e adicionado
184 em um tubo esterilizado contendo meio de cultura líquido Ellighausen, McCullough,
185 Johnson e Harris – DifcoR (EMJH), enriquecido em 15% com soro sanguíneo de coelho
186 (inativado a 60 °C por 30 minutos), e adicionado de 5-fluorouracil a 300mg/L, e ácido
187 nalidixico na concentração de 20mg/L. Posteriormente cada amostra foi identificada e
188 incubada à temperatura de 28°C por 48 horas, e posteriormente, uma alíquota foi repicada
189 em meio EMJH com 15% de enriquecimento com soro sanguíneo de coelho para tentativa
190 de isolamento de *Leptospira*, o restante da amostra com o tecido renal foi congelada a -
191 80°C para aplicação do diagnóstico pela PCR (Ellis et al., 1982; Magajevski et al., 2005;
192 Thiermann, 1980).

193

194 **2.6. Sorologia**

195 As amostras de soro sanguíneo de pequenos mamíferos não voadores foram
196 encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina
197 Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, para a detecção de anticorpos contra
198 25 sorovares de *Leptospira* spp, com 21 sorovares de cepas padrão (Australis,

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

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

211

212 **2.7. PCR**

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

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

224 mM de MgCl₂; 7,5 pmol de cada *primer*; 1X GoTaqReaction Buffer; 250µM de cada
225 desoxinucleotideo trifosfatado (dNTP), 0,5 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e
226 6 µl de DNA. Seguindo o programa de temperaturas: desnaturação inicial de 94°C por 2
227 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por um
228 minuto; e extensão final de 72°C por 5 minutos. Foi utilizado a estirpe padrão *L.*
229 *interrogans* sorovar Copenhageni estirpe FIOCRUZ L1-130 como controle positivo para
230 as reações de PCR.

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

234

235 **2.8. Análise Estatística**

236 A análise estatística foi realizada por meio do teste de associação não-paramétrico de
237 qui-quadrado, para verificar a significância da associação dos fatores estudados. O
238 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>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	-	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. sanarosai</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. sanarosai</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

242 **3. Resultados**

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

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

259

260

261

262

263

264

265

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	%	
	Alto Paranaíba	10	3	30	0	0	
Roedores	Médio Paranaíba	14	6	42,86	0	0	
	Baixo Paranaíba	9	1	11,11	0	0	
	Total Roedores	33	10	30,30	0	0	
	Alto Paranaíba	17	3 ^b	17,65 ^b	0	0	
Marsupiais	Médio Paranaíba	14	9 ^a	64,29 ^a	0	0	
	Baixo Paranaíba	8	2 ^b	25 ^b	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).

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

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

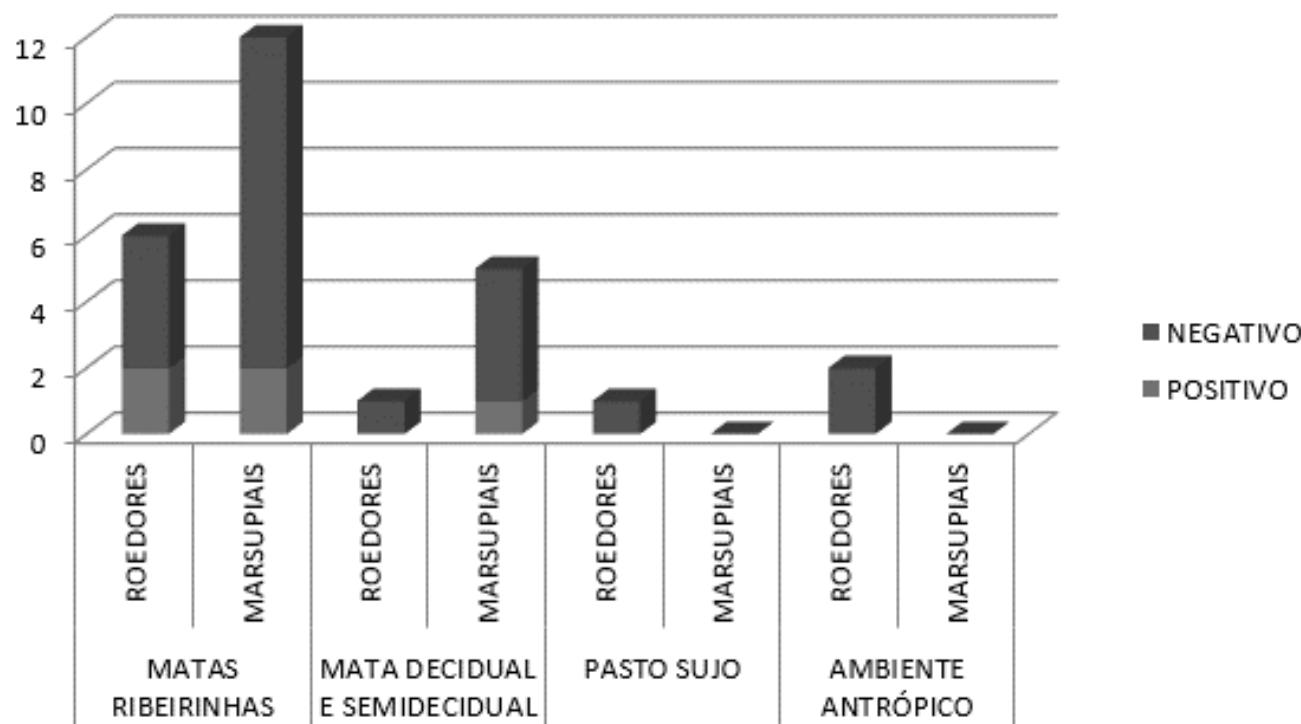
292 O ambiente de matas decíduas e semidecíduas foi o segundo em quantidade de
293 animais capturados (total de 25). Entre os roedores capturaram-se apenas três espécimes,
294 um *Akodon* sp. na região do Alto Paranaíba e negativo à PCR, um *Oecomys bicolor* no
295 Médio Paranaíba, também negativo à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

301 Tabela 2. Pequenos mamíferos não voadores capturados e positivos à PCR do gene *lipL32* de Leptospiros 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		Matas Ribeirinhas	
		n	n	PCR (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)	

304

305



306

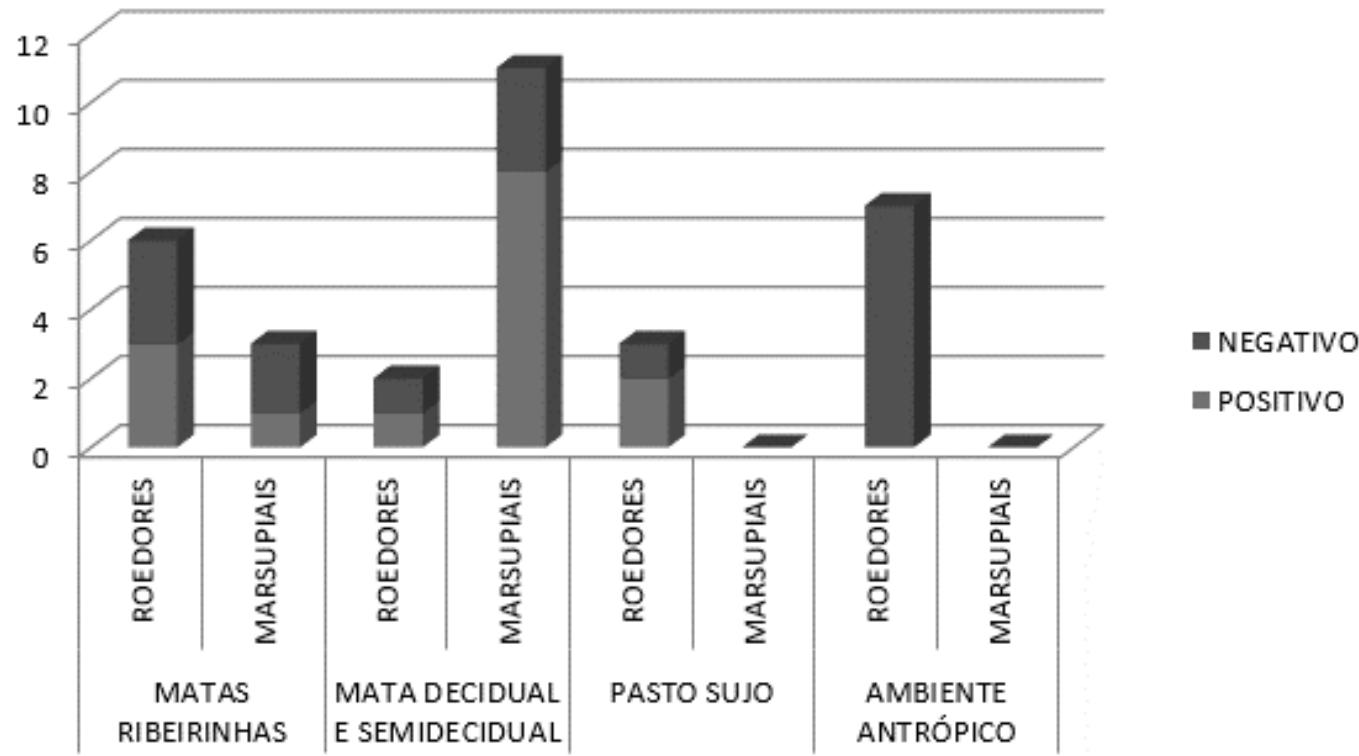
307

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.

308

309

310

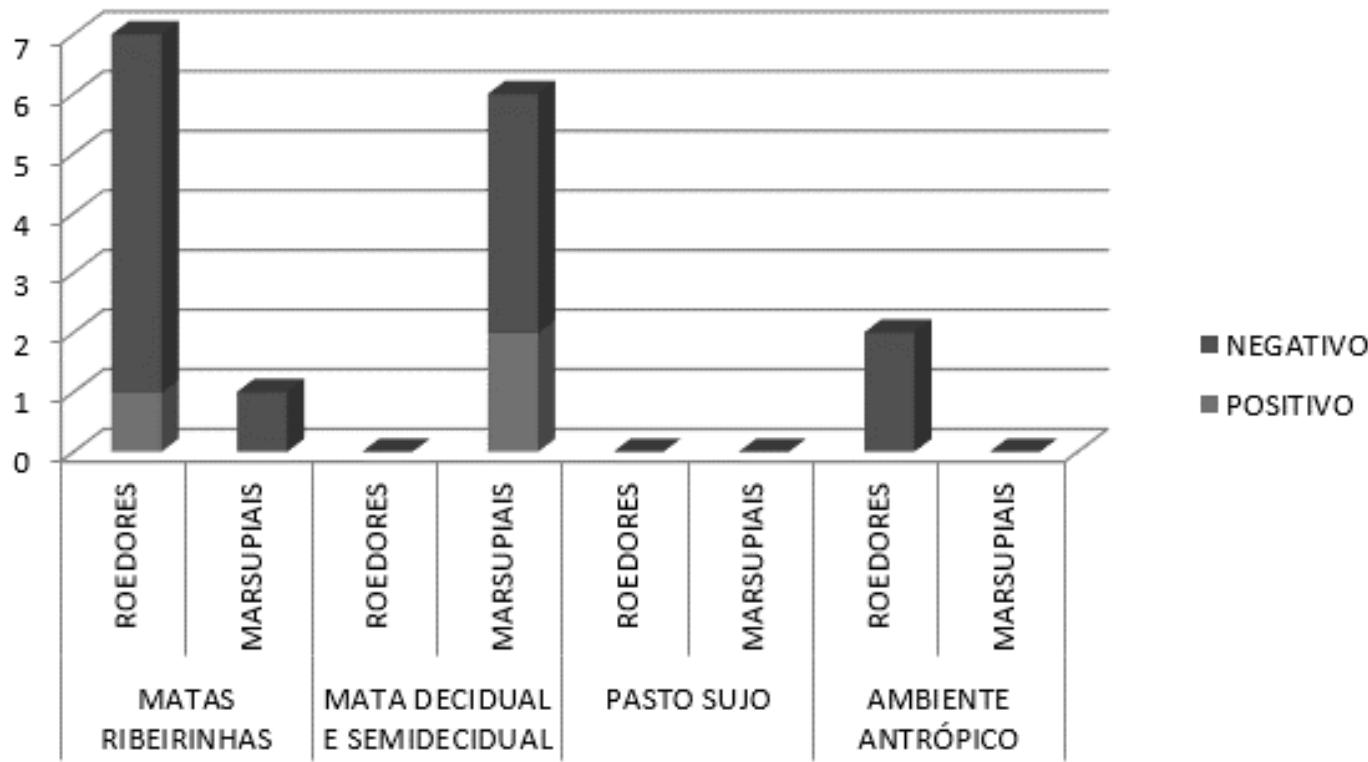


311

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.

320 No ambiente de Pasto Sujo houve apenas quatro capturas, e somente de roedores.

321 Um espécime de *Cerradomys subflavus* no Alto Paranaíba e negativo na PCR, e três
322 espécimes de *Calomys* sp. no Médio Paranaíba, em que dois deles eram portadores renais
323 de Leptospiras patogênicas.

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

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

342 Os dados sobre estação do ano podem ser observados na Tabela 3, os dados
343 referentes a idade e sexo frente aos resultados de PCR estão descritos na Tabela 4, e dados
344 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	Área de coleta	Capturas	Local da armadilha				Estação de coleta			
			não voadores		Árvore	Solo	Final do período chuvoso	Final do período seco		
			n	n	PCR (n/%)	n	PCR (n/%)	n	PCR (n/%)	
	Alto Paranaíba	10	1	0	9	3 (33,34)	4	2 (50)	6	0
Roedores	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)
	Alto Paranaíba	17	13	2 (15,39)	4	1 (25)	7	1 (14,29)	10	2 (20)
Marsupiais	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.

Ambientes de Captura

Área de Captura	Ambiente Antrópico (%)	Pasto Sujo (%)	Matas Deciduais e Semideciduais (%)	
			Matas Deciduais e	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

358 **4. Discussão**

359 Sabe-se bem que os roedores e marsupiais são importantes reservatórios de
360 Leptospiras patogênicas, pois se mantém infectados por um longo período sem manifestar
361 a doença, entretanto considera-se a ordem Rodentia como a principal delas na manutenção
362 deste patógeno no ambiente, inclusive entre os animais selvagens (Adler e de la Peña
363 Moctezuma, 2010; Andersen-Ranberg et al., 2016; Cheema et al., 2007; Costa et al.,
364 2014; Da Silva et al., 2010; Faria et al., 2008; Nakamura et al., 2013; Reilly, 1970). Neste
365 estudo, apenas um espécime de pequeno mamífero, *Gracilinanus agilis*, foi reagente ao
366 MAT para leptospirose, e somente para o sorovar Australis no título de 100. Este animal
367 também foi positivo à PCR, e capturado no ambiente de mata decídua e semidecídua, na
368 região do Baixo Paranaíba.

369 Apesar de outros autores já terem demonstrado uma maior taxa de soroprevalência
370 para leptospirose tanto em marsupiais, quanto em roedores (Bunnell et al., 2000; Costa et
371 al., 2014; Desvars et al., 2013; Dos Santos Paixão et al., 2014; Faria et al., 2008;
372 Lilenbaum et al., 1993; Stritof Majetic et al., 2014; Vieira et al., 2016; Villanueva et al.,
373 2014; Yalin et al., 2011), já foi evidenciado em outras pesquisas que exames sorológicos
374 em hospedeiros reservatórios tendem a uma menor sensibilidade. Podendo apresentarem
375 níveis de anticorpos indetectáveis, devido à relação mais estreita durante o processo
376 evolutivo de ambas espécies (hospedeiro e parasito). Neste processo a patogenicidade e
377 virulência do agente etiológico ao hospedeiro é diminuída, bem como a resposta
378 imunológica do hospedeiro à infecção do parasito (Ellis, 2015; Muthukkaruppan et al.,
379 2007; Sunbul et al., 2001; Vinetz et al., 1996).

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

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

392 Pesquisas envolvendo diagnóstico por PCR em tecido renal para estudo
393 epidemiológico da infecção, ou de portadores renais de Leptospiras patogênicas em
394 pequenos mamíferos não voadores são bastante escassos, principalmente nos biomas
395 brasileiros. A PCR vem sendo mais utilizada para diagnósticos confirmatórios em animais
396 já sabidamente reagentes ao MAT, ou com isolamento de alguma estirpe a partir de urina
397 e tecidos, para espécies selvagens de mamíferos não marsupiais e roedores, ou
398 especificamente entre roedores sinantrópicos (Bunnell et al., 2000; Costa et al., 2014;
399 Desvars et al., 2013; Dos Santos Paixão et al., 2014; Fornazari et al., 2018; Jorge et al.,
400 2012; Stritof Majetic et al., 2014; Vieira et al., 2017, 2016).

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

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

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

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

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

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

447 Os *Gracilinanus agilis* são animais arborícolas (Emmons e Feer, 1997), desta
448 forma foram capturados somente nos ambientes com formação arbórea (mata estacional
449 decidual e semidecidual, e matas ribeirinhas) com destaque para a mata estacional
450 decidual e semidecidual, no Médio Paranaíba, onde dos 11 animais amostrados, 8
451 (72,72%) foram positivos à PCR. Quando se avalia a proporção de portadores renais entre
452 os *Gracilinanus agilis* capturados na campanha do final da estação seca, 69,23% dos
453 animais foram identificados como portadores renais.

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

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

461 E sabendo que *Gracilinanus agilis* apresentam uma dieta mais seletiva
462 (insetívora), nota-se a necessidade desta espécie em ampliar sua área de forrageamento
463 durante o período seco do ano (escassez de alimentos), aumentando assim contato com
464 solo, e com diferentes ambientes. Desta forma são mais desafiados pelas Leptospiras
465 eliminadas por outras espécies animais (selvagens ou domésticas), com *status* de
466 portadoras renais, em sua área de vida, se tornando também portadores (Bagagli et al.,
467 1998; Drancourt et al., 2006; Ko et al., 1999; Martins et al., 2006; Neto e Ramos-Elorduy,
468 2006; Pinheiro et al., 2002; Sarkar et al., 2002).

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

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

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

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

493 *Oecomys bicolor* trata-se de uma espécie arborícola, que habita as áreas florestais
494 da Amazônia, de Mata Atlântica, além de matas de galeria e formações florestais do
495 Cerrado e do Pantanal. Apresenta hábito noturno, e é comumente capturado em
496 vegetações com lianas (Bonvicino et al., 2008; Emmons e Feer, 1997). Foi a espécie de
497 roedor com menor frequência de indivíduos identificados como portadores renais de
498 Leptospiras patogênicas (20%), o que pode ser explicado por seu comportamento mais
499 arborícola, desta forma não apresenta grande contato com o solo e poças d'água, que
500 geralmente estão associados à fatores de risco para infecções pelo contato indireto nos
501 ambientes rural e silvestre (Bagagli et al., 1998; Drancourt et al., 2006; Fornazari et al.,
502 2018).

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

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

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

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

532 As outras duas espécies de roedores capturadas no vale do rio Paranaíba, que
533 também foram positivas à PCR , *Akodon* sp. e *Nectomys squamipes*, já foram relatadas
534 como portadoras renais de Leptospiras patogênicas por isolamento desde a década de
535 1960 (Corrêa et al., 1965-67; Santa Rosa et al., 1975). *Akodon* sp. é característico de
536 ambientes de Mata Atlântica e/ou com influência Atlântica, como é o caso do vale do rio
537 Paranaíba. Três representantes dessa espécie foram coletados na área do Alto Paranaíba,
538 em armadilhas de solo e ambiente de matas ribeirinhas, e um deles foi caracterizado como
539 portador renal pela PCR. A espécie *Nectomys squamipes* também foi capturada na área
540 do Alto Paranaíba (dois espécimes), e na área do Médio Paranaíba (um espécime) em
541 ambiente de matas ribeirinhas, e todos foram positivos à PCR.

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

550 Geralmente a frequência de portadores renais está relacionada à idade e ao sexo,
551 em que pequenos mamíferos não voadores machos e adultos apresentam-se em maiores
552 taxas de prevalência para os diferentes métodos de diagnósticos geralmente utilizados
553 (MAT, PCR, isolamento) (Desvars et al., 2013; Easterbrook et al., 2007; Fornazari et al.,
554 2018; Himsworth et al., 2013; Krojgaard et al., 2009).

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

557 chuvoso existe maior disponibilidade de alimentos no ambiente, o que implica em um
558 menor trabalho para roedores e marsupiais em consegui-los, resultando até na diminuição
559 de suas áreas de vida. Já no período seco essa disponibilidade de alimentos diminui, e os
560 animais precisam forragear e se arriscar mais para se alimentar, além do que se nota uma
561 maior atividade de machos por ser a ocasião de acasalamento (Rocha et al., 2016; Vieira,
562 1997). Por isso verificou-se uma maior abundância de pequenos mamíferos não voadores
563 ao final da estação seca, com um maior número de animais capturados nas três áreas de
564 estudo.

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

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

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

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

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607 **Referências Bibliográficas**

- 608 Adler, B., de la Peña Moctezuma, A., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet.*
 609 *Microbiol.* 140, 287–296. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012
- 610 Agência Nacional de Águas, 2013. Plano de Recursos Hídricos e do Enquadramento
 611 dos Corpos Hídricos Superficiais da Bacia Hidrográfica do Rio Paranaíba.
- 612 Akande, O.A., 2011. A study on wild rat behaviour and control on a pig farm. *Swedish*
 613 *University of Agricultural Sciences.*
- 614 Andersen-Ranberg, E.U., Pipper, C., Jensen, P.M., 2016. Global Patterns of Leptospira
 615 Prevalence in Vertebrate Reservoir Hosts. *J. Wildl. Dis.* 52, 468–477.
 616 doi:10.7589/2014-10-245
- 617 Backhans, A., Jacobson, M., Hansson, I., Lebbad, M., Lambertz, S.T., Gammelgård, E.,
 618 Saager, M., Akande, O., Fellström, C., 2013. Occurrence of pathogens in wild
 619 rodents caught on Swedish pig and chicken farms. *Epidemiol. Infect.* 141, 1885–
 620 1891. doi:10.1017/S0950268812002609
- 621 Bagagli, E., Sano, A., Coelho, K.I., Alquati, S., Miyaji, M., De Camargo, Z.P., Gomes,
 622 G.M., Franco, M., Montenegro, M.R., 1998. Isolation of *Paracoccidioides*
 623 *brasiliensis* from armadillos (*Dasyurus noveminctus*) captured in an endemic area
 624 of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 505–512.
 625 doi:10.4269/ajtmh.1998.58.505
- 626 Bonvicino, C.R., Oliveira, J. a De, Nacinal, M., 2008. Guia dos roedores do Brasil ,
 627 com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. *Biologia* (Bratisl). 15,
 628 120. doi:10.1590/S0031-10492003000600001
- 629 Brooks, T.M., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B., Rylands,
 630 A.B., Konstant, W.R., Flick, P., Pilgrim, J., Oldfield, S., Magin, G., Hilton-Taylor,
 631 C., 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conserv. Biol.*
 632 16, 909–923. doi:10.1046/j.1523-1739.2002.00530.x
- 633 Brownstein, J.S., Holford, T.R., Fish, D., 2003. A climate-based model predicts the
 634 spatial distribution of the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in the United
 635 States. *Environ. Health Perspect.* doi:10.1289/ehp.6052
- 636 Bunnell, J.E., Hice, C.L., Watts, D.M., Montrueil, V., Tesh, R.B., Vinetz, J.M., 2000.
 637 Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infections among mammals captured in
 638 the Peruvian Amazon basin region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63, 255–8.
- 639 Cheema, P.S., Srivastava, S.K., Amutha, R., Singh, S., Singh, H., Sandey, M., 2007.
 640 Detection of pathogenic leptospires in animals by PCR based on lipL21 and lipL32
 641 genes. *Indian J. Exp. Biol.* 45, 568–573.
- 642 Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2013. Guia brasileiro de boas práticas para
 643 eutanásia em animais. Brasília.
- 644 Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, (CONCEA), 2013.
 645 Diretrizes brasileiras para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e
 646 didáticos - DBCA. Brasília.
- 647 Cordeiro, F., Sulzer, C.R., Ramos, A.D.A., Almeida, R.A. De, 1981. *Leptospira*
 648 interrogans in several wildlife species in southeast Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* 1, 19–
 649 29; 28 ref.
- 650 Corrêa, M.O., Hyakutake, S., Natale, V., Galvão, P.A., Aguiar, H., n.d. Estudos sobre
 651 *Leptospira Wolffi* em São Paulo. *Rev. do Inst. Adolfo Lutz* 11, 25–27.
- 652 Corrêa, S.H.R., 2007. Leptospirose, in: Roca (Ed.), *Tratado de Animais Selvagens:*
 653 Medicina Veterinária. São Paulo, pp. 736–741.
- 654 Costa, F., Porter, F.H., Rodrigues, G., Farias, H., de Faria, M.T., Wunder, E.A.,
 655 Osikowicz, L.M., Kosoy, M.Y., Reis, M.G., Ko, A.I., Childs, J.E., 2014. *Infections*

- 656 by *Leptospira interrogans*, Seoul Virus, and *Bartonella* spp. Among Norway Rats
 657 (*Rattus norvegicus*) from the Urban Slum Environment in Brazil. Vector-Borne
 658 Zoonotic Dis. 14, 33–40. doi:10.1089/vbz.2013.1378
- 659 Da Silva, E.F., Félix, S.R., Cerqueira, G.M., Fagundes, M.Q., Neto, A.C.P.S.,
 660 Grassmann, A.A., Amaral, M.G., Gallina, T., Dellagostin, O.A., 2010. Short
 661 report: Preliminary characterization of *Mus musculus*-derived pathogenic strains of
 662 *Leptospira borgpetersenii* serogroup Ballum in a hamster model. Am. J. Trop.
 663 Med. Hyg. 83, 336–337. doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0120
- 664 Daszak, P., Tabor, G.M., Kilpatrick, A.M., Epstein, J., Plowright, R., 2004.
 665 Conservation medicine and a new agenda for emerging diseases, in: Annals of the
 666 New York Academy of Sciences. pp. 1–11. doi:10.1196/annals.1307.001
- 667 de Souza, M.A., de Castro, J.R., Moreira, R.Q., Bombonato, N.G., Soares, P.M.,
 668 Correia Lima, A.M., 2016. Anti-*Leptospira* spp. Antibodies in Several Animal
 669 Species on the Same Farm. Biosci. J. 32, 202–207.
- 670 Desvars, A., Michault, A., Chiroleu, F., 2013. Influence of risk factors on renal
 671 leptospiral load in naturally infected wild black rats. Acta Trop. 125, 258–261.
 672 doi:10.1016/j.actatropica.2012.11.011
- 673 Dos Santos Paixão, M., Alves-Martin, M.F., Tenório, M. da S., Starke-Buzetti, W.A.,
 674 Alves, M.L., da Silva, D.T., Ferreira, A.G., e Silva, M.F., Sousa, L.O., Lucheis,
 675 S.B., 2014. Serology, isolation, and molecular detection of *Leptospira* spp. from
 676 the tissues and blood of rats captured in a wild animal preservation centre in Brazil.
 677 Prev. Vet. Med. 115, 69–73. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.03.016
- 678 Drancourt, M., Houhamdi, L., Raoult, D., 2006. *Yersinia pestis* as a telluric, human
 679 ectoparasite-borne organism. Lancet Infect. Dis. doi:10.1016/S1473-
 680 3099(06)70438-8
- 681 Easterbrook, J.D., Kaplan, J.B., Vanasco, N.B., Reeves, W.K., Purcell, R.H., Kosoy,
 682 M.Y., Glass, G.E., Watson, J., Klein, S.L., 2007. A survey of zoonotic pathogens
 683 carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA. Epidemiol. Infect. 135,
 684 1192–1199. doi:10.1017/S0950268806007746
- 685 Ellis, W.A., 2015. Animal Leptospirosis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 387, 99–137.
 686 doi:10.1007/978-3-662-45059-8_6
- 687 Ellis, W.A., O'Brien, J.J., Neill, S.D., Hanna, J., 1982. Bovine leptospirosis: serological
 688 findings in aborting cows. Vet. Rec. 110, 178–80. doi:10.1136/vr.110.8.178
- 689 Emmons, L., Feer, F., 1997. Neotropical rainforest mammals: a field guide.
- 690 Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P., 1999. Clinical laboratory diagnosis of
 691 leptospirosis, *Leptospira* and Leptospirosis.
- 692 Faria, M.T. de Calderwood, M.S., Athanazio, D.A., McBride, A.J.A., Hartskeerl, R.A.,
 693 Pereira, M.M., Ko, A.I., Reis, M.G., 2008. Carriage of *Leptospira interrogans*
 694 among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in
 695 Brazil. Acta Trop. 108, 1–5. doi:10.1016/j.actatropica.2008.07.005
- 696 Fávero, J.F., de Araújo, H.L., Lilenbaum, W., Machado, G., Tonin, A.A., Baldissera,
 697 M.D., Stefani, L.M., Da Silva, A.S., 2017. Bovine leptospirosis: prevalence,
 698 associated risk factors for infection and their cause-effect relation. Microb. Pathog.
 699 107, 149–154.
- 700 Fish, D., 1995. Environmental risk and prevention of Lyme disease. Am. J. Med. 98,
 701 2S–9S. doi:10.1016/S0002-9343(99)80038-2
- 702 Fornazari, F., Langoni, H., Marson, P.M., Nóbrega, D.B., Teixeira, C.R., 2018.
 703 Leptospira reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents. Acta Trop. 178,
 704 205–212. doi:10.1016/j.actatropica.2017.11.019
- 705 Himsworth, C.G., Bidulka, J., Parsons, K.L., Feng, A.Y.T., Tang, P., Jardine, C.M.,

- 706 Kerr, T., Mak, S., Robinson, J., Patrick, D.M., 2013. Ecology of *Leptospira*
 707 *interrogans* in Norway rats (*Rattus norvegicus*) in an inner-city neighborhood of
 708 Vancouver, Canada. PLoS Negl. Trop. Dis. 7. doi:10.1371/journal.pntd.0002270
- 709 Instituto Nacional de Pesquisa Espacial, (INPE), 2016. Centro de Previsão de Tempo e
 710 Estudos Climáticos [WWW Document]. URL www.cptec.inpe.br/cidades
 711 (accessed 2.3.17).
- 712 Jorge, S., Hartleben, C.P., Seixas, F.K., Coimbra, M.A.A., Stark, C.B., Larrondo, A.G.,
 713 Amaral, M.G., Albano, A.P.N., Minello, L.F., Dellagostin, O.A., Brod, C.S., 2012.
 714 *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum (*Didelphis*
 715 *albiventris*): First isolation in Brazil. Acta Trop. 124, 147–151.
 716 doi:10.1016/j.actatropica.2012.07.009
- 717 Ko, A.I., Galvão Reis, M., Ribeiro Dourado, C.M., Johnson, W.D., Riley, L.W., 1999.
 718 Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Lancet 354, 820–825.
 719 doi:10.1016/S0140-6736(99)80012-9
- 720 Köppen, W., 1948. Climatologia. México. Fundo Cult. Econômica.
- 721 Krojgaard, L.H., Villumsen, S., Markussen, M.D.K., Jensen, J.S., Leirs, H., Heiberg,
 722 A.C., 2009. High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*).
 723 Epidemiol. Infect. 137, 1586–1592. doi:10.1017/S0950268809002647
- 724 Lee, G., Goosens, K.A., 2015. Sampling Blood from the Lateral Tail Vein of the Rat. J.
 725 Vis. Exp. doi:10.3791/52766
- 726 Lilenbaum, W., Ribeiro, V., Martin, E., Bispo, V., 1993. Estudo sorológico para
 727 detecção de anticorpos anti-leptospira em *Rattus norvegicus* de Duque de Caxias,
 728 Rio de Janeiro, Brasil. Rev. Latinoam. Microbiol. 35, 357–380.
- 729 Lins, Z.C., Lopes, M.L., 1984. Isolation of *Leptospira* from wild forest animals in
 730 Amazonian Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 78, 124–126.
 731 doi:10.1016/0035-9203(84)90191-3
- 732 LoGiudice, K., Ostfeld, R.S., Schmidt, K.A., Keesing, F., 2003. The ecology of
 733 infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme
 734 disease risk. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 567–71.
 735 doi:10.1073/pnas.0233733100
- 736 Lopes, G.P., Leiner, N.O., 2015. Semelparity in a population of *gracilinanus agilis*
 737 (Didelphimorphia: Didelphidae) inhabiting the Brazilian cerrado. Mamm. Biol. 80,
 738 1–6. doi:10.1016/j.mambio.2014.08.004
- 739 Magajevski, F.S., Silva Girio, R.J., Mathias, L.A., Myashiro, S., Genovez, M.É.,
 740 Scarcelli, E.P., 2005. Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls
 741 serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. Brazilian J.
 742 Microbiol. 36, 43–47. doi:10.1590/S1517-83822005000100009
- 743 Martins, E.G., Bonato, V., Pinheiro, A., dos Reis, S.F., 2006. Variation in the food-
 744 niche width of *Gracilinanus microtarsus* (Didelphimorphia: Didelphidae) in a
 745 cerrado remnant in south-eastern Brazil. Mamm. Biol. 71, 304–308.
 746 doi:10.1016/j.mambio.2006.03.001
- 747 Miller, R.S., Farnsworth, M.L., Malmberg, J.L., 2013. Diseases at the livestock-wildlife
 748 interface: Status, challenges, and opportunities in the United States. Prev. Vet.
 749 Med. 110, 119–132. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.11.021
- 750 Muthukkaruppan, V., Hartskeerl, R., Priya, C., Hoogendijk, K., Berg, M., Rathinam, S.,
 751 Ahmed, A., 2007. Field rats form a major infection source of leptospirosis in and
 752 around Madurai, India. J. Postgrad. Med. 53, 236. doi:10.4103/0022-3859.37511
- 753 Nakamura, I., Hang-Ombe, B.M., Sawa, H., Kobayashi, S., Orba, Y., Ishii, A., Thomas,
 754 Y., Isozumi, R., Yoshimatsu, K., Mweene, A.S., Takada, A., Sugimoto, C.,
 755 Arikawa, J., 2013. Cross-Reactivity of Secondary Antibodies against African

- 756 Rodents and Application for Sero-Surveillance. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 819–825.
 757 doi:10.1292/jvms.12-0471
- 758 Neto, E.M.C., Ramos-Elorduy, J., 2006. Los Insectos Comestibles De Brasil: Etnicidad,
 759 Diversidad E Importancia En La Alimentación. *Boletín Soc. Entomológica
 760 Aragón.* 38, 1–38.
- 761 Oliveira-Filho, A.T., Ratter, J.A., 2002. Vegetation Physiognomies and Wood Flora of
 762 the Cerrado Biome, in: *The Cerrados of Brazil.* pp. 91–120. doi:10.1663/0013-
 763 0001(2003)057[0656:DFABRE]2.0.CO;2
- 764 Ostfeld, R.S., Keesing, F., 2000. Biodiversity and disease risk: The case of Lyme
 765 disease. *Conserv. Biol.* doi:10.1046/j.1523-1739.2000.99014.x
- 766 Pardini, R., 2004. Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic
 767 Forest landscape. *Biodivers. Conserv.* 13, 2567–2586.
 768 doi:10.1023/B:BIOC.0000048452.18878.2d
- 769 Pinheiro, F., Diniz, I.R., Coelho, D., Bandeira, M.P.S., 2002. Seasonal pattern of insect
 770 abundance in the Brazilian cerrado. *Austral Ecol.* 27, 132–136. doi:10.1046/j.1442-
 771 9993.2002.01165.x
- 772 Primack, R.B., Rodrigues, E., 2001. *Biologia da conservação*, Editora Planta.
 773 doi:10.4257/oeco.2009.1303.01
- 774 Prusinski, M.A., Chen, H., Drobnick, J.M., Kogut, S.J., Means, R.G., Howard, J.J.,
 775 Oliver, J., Lukacik, G., Backenson, P.B., White, D.J., 2006. Habitat Structure
 776 Associated with *Borrelia burgdorferi* Prevalence in Small Mammals in New York
 777 State. *Environ. Entomol.* 35, 308–319. doi:10.1603/0046-225X-35.2.308
- 778 R Development Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical
 779 Computing. R Found. Stat. Comput. Vienna Austria 0, {ISBN} 3-900051-07-0.
 780 doi:10.1038/sj.hdy.6800737
- 781 Ramos, V.D.N., 2007. Ecologia alimentar de pequenos mamíferos de áreas de cerrado
 782 no sudeste do Brasil. (2007), 68.f. *Ecol. Aliment. pequenos mamíferos áreas
 783 cerrado no sudeste do Bras.* Mestr. em Ecol. e Conserv. Recur. Naturais. Univ.
 784 Fed. Uberlândia, Uberlândia.
- 785 Ratter, J.A., Ribeiro, J.F., Bridgewater, S., 1997. The Brazilian cerrado vegetation and
 786 threats to its biodiversity. *Ann. Bot.* 80, 223–230. doi:10.1006/anbo.1997.0469
- 787 Reilly, J.R., 1970. The susceptibility of five species of wild animals to experimental
 788 infection with *Leptospira grippotyphosa*. *J. Wildl. Dis.* 6, 289–294.
 789 doi:10.7589/0090-3558-6.4.289
- 790 Rocha, C.R., Ribeiro, R., Marinho-Filho, J., 2016. Seasonal variations and population
 791 parameters explaining the use of space of neotropical rodents. *Mamm. Biol.* 81,
 792 551–557. doi:10.1016/j.mambio.2016.07.043
- 793 Santa Rosa, C.A., Sulzer, C.R., Giorgi, W., da Silva, A.S., Yanaguita, R.M., Lobao,
 794 A.O., 1975. Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of a new serotype in the
 795 pyrogenes group. *Am. J. Vet. Res.* 36, 1363–1365.
- 796 Sarkar, U., Nascimento, S.F., Barbosa, R., Martins, R., Nuevo, H., Kalafanos, I.,
 797 Grunstein, I., Flannery, B., Dias, J., Riley, L.W., Reis, M.G., Ko, A.I., 2002.
 798 Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during
 799 an urban epidemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 605–610.
 800 doi:10.4269/ajtmh.2002.66.605
- 801 Silva, F.J. da, 2014. Epidemiologia da infecção por *Leptospira* spp. em áreas rurais nos
 802 biomas brasileiros.
- 803 Stritof Majetic, Z., Galloway, R., Ruzic Sabljic, E., Milas, Z., Mojce Perko, V., Habus,
 804 J., Margaletic, J., Pernar, R., Turk, N., 2014. Epizootiological survey of small
 805 mammals as *Leptospira* spp. reservoirs in Eastern Croatia. *Acta Trop.* 131, 111–

- 806 116. doi:10.1016/j.actatropica.2013.12.009
807 Sunbul, M., Esen, S., Leblebicioglu, H., Hokelek, M., Pekbay, A., Eroglu, C., 2001.
808 Rattus norvegicus acting as reservoir of leptospira interrogans in the Middle Black
809 Sea region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to
810 Leptospira strain. Scand. J. Infect. Dis. 33, 896–898.
811 doi:10.1080/00365540110076796
812 Thiermann, A.B., 1980. Canine leptospirosis in Detroit. Am. J. Vet. Res. 41, 1659–
813 1661.
814 Vieira, A.S., Narduche, L., Martins, G., Schabib Péres, I.A.H.F., Zimmermann, N.P.,
815 Juliano, R.S., Pellegrin, A.O., Lilenbaum, W., 2016. Detection of wild animals as
816 carriers of Leptospira by PCR in the Pantanal biome, Brazil. Acta Trop. 163, 87–
817 89. doi:10.1016/j.actatropica.2016.08.001
818 Vieira, A.S., Pinto, P.S., Lilenbaum, W., 2017. A systematic review of leptospirosis on
819 wild animals in Latin America. Trop. Anim. Health Prod. 1–10.
820 doi:10.1007/s11250-017-1429-y
821 Vieira, M.V., 1997. Dynamics of a rodent assemblage in a cerrado of southeast Brazil.
822 Rev. Bras. Biol.
823 Villanueva, S.Y.A.M., Saito, M., Baterna, R.A., Estrada, C.A.M., Rivera, A.K.B., Dato,
824 M.C., Zamora, P.R.F.C., Segawa, T., Cavinta, L.L., Fukui, T., Masuzawa, T.,
825 Yanagihara, Y., Gloriani, N.G., Yoshida, S. ichi, 2014. Leptospira-rat-human
826 relationship in Luzon, Philippines. Microbes Infect. 16, 902–910.
827 doi:10.1016/j.micinf.2014.07.001
828 Vinetz, J.M., Glass, G.E., Flexner, C.E., Mueller, P., Kaslow, D.C., 1996. Sporadic
829 Urban Leptospirosis. Ann. Intern. Med. 125, 794–798.
830 doi:10.3402/jchimp.v1i1.7042
831 Yalin, W., Lingbing, Z., Hongliang, Y., Jianmin, X., Xiangyan, Z., Xiaokui, G., Utpal,
832 P., Jinhong, Q., 2011. High prevalence of pathogenic Leptospira in wild and
833 domesticated animals in an endemic area of China. Asian Pac. J. Trop. Med. 4,
834 841–845. doi:10.1016/S1995-7645(11)60205-8

835	
836	
837	
838	
839	
840	
841	
842	
843	
844	
845	CAPÍTULO 3
846	
847	
848	Papel de marsupiais e roedores na manutenção e veiculação de leptospiras
849	patogênicas em rebanho bovino com leptospirose
850	
851	
852	
853	
854	
855	
856	
857	
858	
859	

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

862

863 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 sorogrupo 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 leptospires patogênicas neste ambiente, favorecendo a infecção das espécies comunicantes, como os bovinos.

878

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

880

881

882 1. Introdução

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

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

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

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

903 O bioma Cerrado é o segundo maior do Brasil, cobrindo originalmente cerca de 2
904 milhões de km², o que corresponde a 23% do território do país (Oliveira-Filho e Ratter,
905 2002). Mais da metade da área original tornou-se pastagens e culturas nos últimos 35
906 anos, restando apenas 20% de sua área original (Mittermeier et al., 1999). Isso chama a
907 atenção para um contato cada vez mais íntimo entre os animais de produção, roedores
908 sinantrópicos, humanos, e as espécies de pequenos mamíferos selvagens, fato que
909 intensifica o fluxo de *Leptospira* spp. no ambiente rural, aumentando o risco ocupacional

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

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

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

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

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

937

938 **2. Material e Métodos**

939 **2.1. Local**

940 O estudo foi realizado na Fazenda Mata da Fartura, no município de Goianira,
941 localizada no sudeste do estado de Goiás sob as coordenadas geográficas 18,1630556S;
942 48,1354722W. Esta é uma propriedade de aproximadamente 68 hectares, caracterizada
943 pela presença de pastagens com muitos fragmentos de matas nativas (formações florestais
944 de Cerrado com influência de Mata Atlântica – área de ecótono) sobre solos rochosos e
945 pouco profundos, e intercomunicantes entre si, e com livre acesso para bovinos.

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

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

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

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

968

969 **2.2. Questões éticas**

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

977

978 **2.3.Bovinos**

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

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

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

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

995

996 **2.4. Ambientes de captura dos pequenos mamíferos**

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

999 5. Ambiente antrópico: Considerou-se ambiente antrópico os locais próximos
1000 a habitações humanas, paióis, casas de máquinas, galpões de armazenamento de insumos.

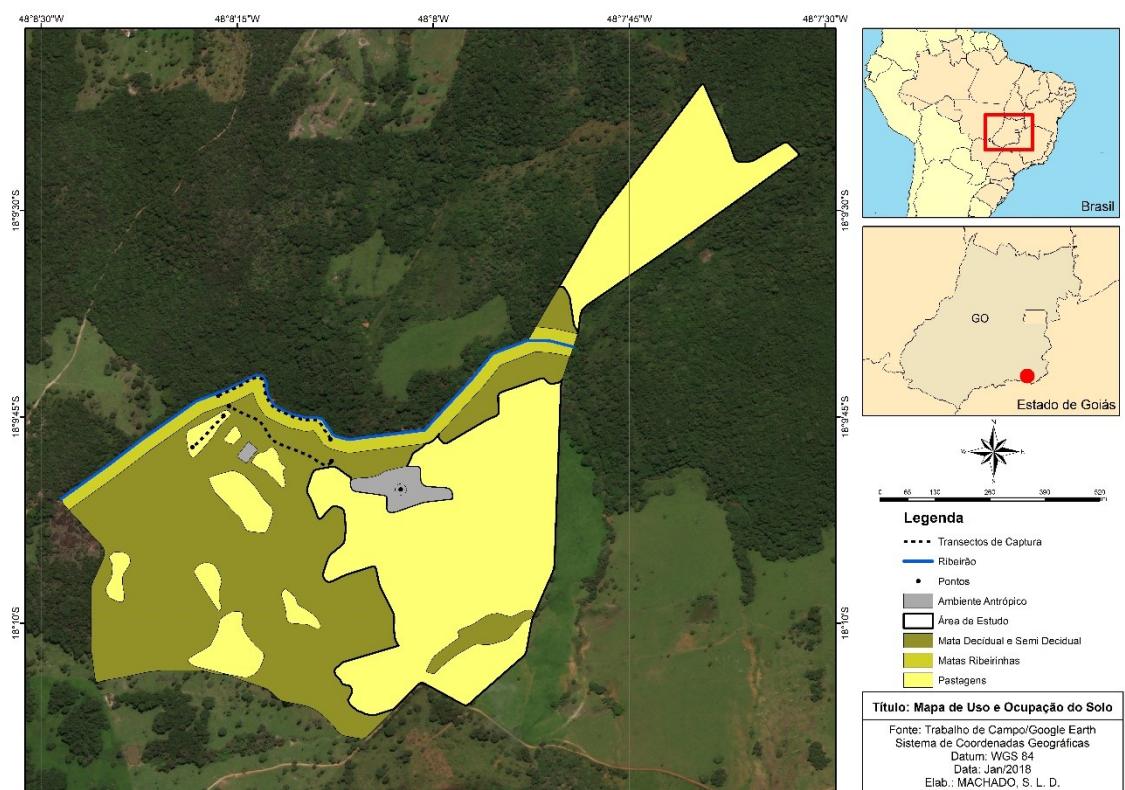
1001 6. Mata estacional decidual e semidecidual: Considerou-se como mata
1002 estacional decidual e semidecidual as formações compostas por estrato arbóreo que
1003 durante a estação seca perde toda ou parte das folhas, segundo a classificação de Oliveira-
1004 Filho e Ratter (2002).

1005 7. Matas ribeirinhas: Considerou-se como matas ribeirinhas, seguindo a
1006 caracterização de Oliveira-Filho e Ratter (2002), aquelas matas estacionais semideciduais
1007 ou deciduais que acompanham a margem do Ribeirão Mata da Fartura.

1008 8. Pasto sujo: Considerou-se pasto sujo a área utilizada para pastoreio do
 1009 gado, com predomínio do capim *Brachiaria decumbens* em sua altura máxima de
 1010 crescimento. O pasto amostrado é margeado por alguma das matas já descritas e utilizadas
 1011 para coleta de pequenos mamíferos.

1012

1013 Figura 1 - Mapa do uso e ocupação do solo e transectos de captura de pequenos mamíferos
 1014 não voadores. Fazenda Mata da Fartura, Goiandira - Goiás, Brasil, 2016.



1015

1016

2.5. Captura dos pequenos mamíferos

1018 Duas campanhas, de quatro noites cada, foram conduzidas para captura de
 1019 pequenos mamíferos, uma ao final da estação chuvosa (precipitação acumulada de
 1020 outubro de 2015 a março de 2016: 1260 mm) e outra no final da seca (precipitação
 1021 acumulada de abril a setembro de 2016: 195 mm) (INPE, 2016).

1022 Foram utilizadas armadilhas dos modelos *Sherman* e *Tomahawk*, iscadas com
 1023 rodelas de banana cobertas por farelo de paçoca. Para captura no ambiente antrópico

1024 foram utilizadas, em média, oito armadilhas tipo *Sherman* colocadas em variados pontos
1025 considerados propícios. Para os ambientes de mata decidual e semidecidual, e de matas
1026 ribeirinhas, 50 armadilhas tipo *Sherman* foram montadas em cada uma das duas
1027 fisionomias, dispostas em linhas com estações de captura a cada dez metros, sendo uma
1028 armadilha armada sobre o solo e outra sobre uma árvore em cada estação. Na área de
1029 pasto, oito armadilhas tipo *Tomahawk*, e oito, tipo *Sherman*, foram colocadas linearmente
1030 sobre o solo a cada dez metros. Todas as armadilhas foram inspecionadas diariamente
1031 pela manhã, com a isca trocada a cada 48 horas ou repostada quando necessário.

1032 Os animais capturados foram contidos farmacologicamente com associação de
1033 cloridrato de tiletamina 250mg e cloridrato de zolazepam 250mg na dose de 0,1ml/kg,
1034 pela via intramuscular (Silva, 2014) para biometria e sexagem. As fêmeas prenhas e em
1035 amamentação foram acondicionadas em sacos de algodão até a recuperação completa, e
1036 posteriormente soltas nos seus respectivos locais de captura. Os demais espécimes foram
1037 eutanasiados por exsanguinação intracardíaca (CFMV, 2013; CONCEA, 2013).

1038

1039 **2.6. Coleta de Material Biológico**

1040 2.6.1. Pequenos Mamíferos

1041 Os animais não eutanasiados foram submetidos apenas à punção sanguínea na veia
1042 lateral da cauda (Lee e Goosens, 2015). Naqueles eutanasiados, coletou-se sangue pelo
1043 método da exsanguinação intracardíaca. As amostras de sangue foram armazenadas em
1044 microtubos até a retração do coágulo, e posteriormente fez-se a separação do soro
1045 sanguíneo. As amostras de soro foram devidamente identificadas e armazenadas a -20 °C
1046 (CFMV, 2013; CONCEA; Silva, 2014).

1047 Também nos espécimes eutanasiados, fez-se uma incisão abdominal para retirada
1048 dos rins. Tão logo retirou-se os órgãos, próximo a um bico de Bunsen com chama azul, e

1049 utilizando bisturi estéril, cada rim foi recortado e adicionado em um tubo esterilizado
1050 contendo meio de cultura líquido Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris – DifcoR
1051 (EMJH), enriquecido em 15% com soro sanguíneo de coelho (inativado a 60°C por 30
1052 minutos), e adicionado de 5-fluorouracil a 300 mg/L, e ácido nalidixico na concentração
1053 de 20mg/L. Posteriormente cada amostra foi identificada e incubada à temperatura de
1054 28°C por 48 horas, para depois ser congelada a -80°C (Ellis et al., 1982; Magajevski et
1055 al., 2005; Thiermann, 1980).

1056

1057 2.6.2. Sorologia

1058 As amostras de soro sanguíneo de bovinos e pequenos mamíferos foram
1059 encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas da Faculdade de Medicina
1060 Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, para a detecção de anticorpos contra
1061 25 sorovares de *Leptospira* spp, sendo 21 sorovares de cepas padrão (Australis,
1062 Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Castelonis, Copenhageni, Cynopteri,
1063 Djasiman, Guaricura, Grippotyphosa, Hardjobovis, Hardjoprajitno, Hebdomadis,
1064 Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Sejroe, Shermani, Tarassovi e Wolffi), e quatro
1065 sorovares de estirpes de isolados de pequenos mamíferos sinantrópicos e selvagens no
1066 Brasil (Brasiliensis, Pomona e 2 cepas diferentes de Copenhageni) (Quadro 1).

1067 Tais coleções de cepas padrão e de estirpes de isolados brasileiros foram
1068 gentilmente doadas pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Departamento de
1069 Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal Fluminense.

1070 O diagnóstico sorológico foi feito pelo método de Soroaglutinação Microscópica
1071 (MAT), padronizando-se reagente maior ou igual a 50% de aglutinação de antígenos por
1072 campo a uma diluição final de 1:100 do soro sanguíneo, tanto em bovinos como em

1073 roedores e marsupiais (Faine et al., 1999; Faria et al., 2008; Jorge et al., 2012; dos Santos
1074 Paixão et al., 2014; Majetic et al., 2014; Silva, 2014).

1075

1076 2.6.3. PCR

1077 Os fragmentos renais foram enviados ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária
1078 da Universidade Federal Fluminense para realização de extração de DNA e ensaio da
1079 PCR para detecção do gene *lipL32*, comum a estirpes patogênicas de leptospiros. A
1080 extração de DNA de tecido foi realizada com Kit DNeasy® blood & Tissue Kit (Qiagen)
1081 conforme instruções do fabricante. Uma etapa prévia de lavagem e digestão do tecido foi
1082 realizada: duas lavagens com 2 ml de tampão PBS 1 vez por duas horas cada e com 20µl
1083 de Proteinase K 20 mg/ml (Invitrogen®) à 56°C até completa digestão.

1084 No ensaio da PCR para a detecção do gene *lipL32* foram empregados os *primers*
1085 *lipL32-45F* (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') e *lipL32-286R* (5'-GAA CTC
1086 CCA TTT CAG CGA TT-3'), projetados por Stoddard et al. (2009), na qual amplifica-se
1087 um fragmento de 243pb. A reação foi realizada com volume final de 25µl contendo: 3,5
1088 mM de MgCl₂; 7,5 pmol de cada *primer*; 1 vez GoTaqReaction Buffer; 250µM de cada
1089 desoxinucleotideo trifosfatado (dNTP), 0,5 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e
1090 6 µl de DNA. Segundo o programa de temperaturas: desnaturação inicial de 94°C por 2
1091 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto;
1092 e extensão final de 72°C por 5 minutos. Foi utilizado a estirpe padrão *L. interrogans*
1093 sorovar Copenhageni estirpe FIOCRUZ L1-130 como controle positivo para as reações
1094 de PCR. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 2% com tampão 0,5 X TBE (Tris
1095 – ácido bórico – EDTA). O DNA presente nos produtos de PCR foi corado com uma
1096 solução 20X Gel Red® (Biotium) e visualizados sob luz ultravioleta.

1097

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>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	-	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

1105 **3. Resultados**

1106 **3.1. Bovinos**

1107 Dos 66 bovinos, 60 (90,91%) foram reagentes ao MAT para pelo menos um
 1108 sorovar de leptospirose (Tabela 1), o que sugere comportamento enzoótico neste rebanho,
 1109 dada a manutenção da prevalência em taxas semelhantes (87,2%) desde o ano de 2006
 1110 (Moreira et al., 2010). É importante ressaltar que nenhuma medida de controle para
 1111 leptospirose foi adotada após o diagnóstico de 2006. O manejo sanitário, alimentar e de
 1112 dessendenciação, bem como os insumos e instalações utilizados, não foram modificados.
 1113 Houve diferenças estatísticas significantes somente entre a faixa etária ($p = 0,0087$), em
 1114 que animais acima de 24 meses se apresentavam com maior frequência de aglutininas
 1115 anti-leptospiras patogênicas, se comparados aos animais abaixo de 24 meses de idade.

1116

1117 Tabela 1 - Frequência de bovinos reagentes ao MAT para leptospirose e suas respectivas
 1118 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 ^b	73,68 ^b
Idade > 24 meses	47	46 ^a	97,87 ^a
Total	66	60	90,91

1119 Letras diferentes entre linhas indicam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$)

1120

1121 Em ordem decrescente de frequência, encontrou-se reagentes para os seguintes
 1122 sorovares (Tabela 2): Icterohaemorrhagiae e Pomona cepa M36/05 ($n=31/51,66\%$);
 1123 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 Hardjoprajitino
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 Sorogrupo 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; *Oecomys bicolor*, n = 2;
 1161 *Rattus rattus*, n = 3). Destes, três fêmeas (*Gracilinanus agilis*, n = 1; *Oecomys bicolor*, n

1162 = 1; *Hylaeamys megacephalus*, n = 1) foram liberadas após recuperação da contenção
1163 farmacológica por estarem prenhes ou em amamentação.

1164 Nenhum dos espécimes de roedores e marsupiais capturados foram reagentes ao
1165 MAT. Para os resultados da PCR para o gene *lipL32*, 15 (53,57%) dos 28 espécimes de
1166 pequenos mamíferos foram positivos. Destes, nove (64,29%) espécimes de *Gracilinanus*
1167 *agilis* e seis (42,86%) espécimes de roedores (*Calomys* sp., n = 2; *Hylaeamys*
1168 *megacephalus*, n = 2; *Oecomys bicolor*, n = 1; *Nectomys squamipes*, n = 1) tiveram
1169 amplificado o gene *lipL32* a partir de suas amostras renais (Tabela 4). A taxa de captura
1170 e de espécimes positivas à PCR foi maior ao final da estação seca, em que dos 23
1171 pequenos mamíferos capturados (13 marsupiais e dez roedores), 14 (nove marsupiais e
1172 cinco roedores) estavam positivos. Em contrapartida, ao final da estação chuvosa foram
1173 capturados apenas cinco exemplares, sendo quatro roedores e um marsupial, e destes,
1174 apenas um roedor, *Hylaeamys megacephalus*, foi positivo à PCR.

1175 Ao se considerar o total de espécimes de pequenos mamíferos capturados por
1176 ambiente, tem-se em ordem decrescente mata estacional decidual e semidecidual (13
1177 animais, nove positivos na PCR), matas ribeirinhas (nove animais, quatro positivos na
1178 PCR), pasto sujo (três animais, sendo dois positivos na PCR) e ambiente antrópico (três
1179 animais, e nenhum positivo na PCR).

1180 Quando se considera o local de instalação das armadilhas, solo ou árvore, a
1181 abundância foi numericamente maior no solo, alcançando 17 espécimes capturados. Já
1182 em armadilhas instaladas em árvores, capturou-se apenas 11 espécimes. E a ocorrência
1183 do gene *lipL32* foi encontrado em dez dos pequenos mamíferos capturados no solo
1184 (58,82%), e cinco dos espécimes recolhidos em armadilhas de árvore (45,45%).

1185 Não houve diferença estatística para frequências de reação positiva à PCR entre
1186 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 leptospiras patogênicas 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

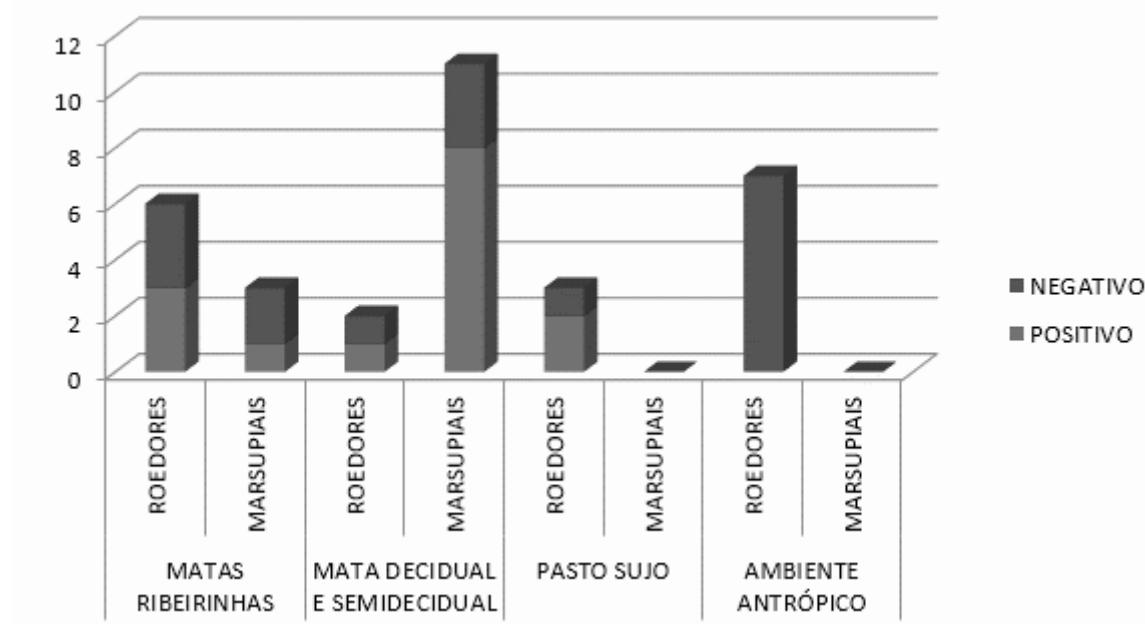
1195

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

1202 **4. Discussão**

1203 Mesmo os pequenos mamíferos capturados não terem apresentado aglutininas
1204 contra qualquer sorovar de *Leptospira* spp., os resultados da PCR positiva em 15 amostras
1205 de rim, dos 28 animais capturados (53,57%), indicam uma alta taxa de portadores renais
1206 de leptospiras patogênicas (Vieira et al., 2016). Esta maior taxa pode ser justificada
1207 também por uma maior sensibilidade da PCR em tecido renal, em detrimento do uso de
1208 urina para identificação do gene *lipL32*, dada a eliminação intermitente de leptospiras por
1209 essa via de excreção (Fornazari et al., 2018), visto que a PCR é considerada uma adequada
1210 técnica epidemiológica para detecção de reservatórios (Faria et al., 2008). Assim, os
1211 pequenos mamíferos se configuraram como agentes de destaque na epidemiologia da
1212 leptospirose na área estudada.

1213 Sabe-se que os roedores e marsupiais são importantes reservatórios de leptospiras
1214 patogênicas, pois se mantêm infectados por um longo período sem manifestar a doença.
1215 Entretanto considera-se a ordem Rodentia como a principal delas na manutenção deste
1216 patógeno no ambiente, inclusive entre os animais selvagens (Adler e de la Peña
1217 Moctezuma, 2010; Andersen-Ranberg et al., 2016; Cheema et al., 2007; Costa et al.,
1218 2014; Da Silva et al., 2010; Faria et al., 2008; Nakamura et al., 2013; Reilly, 1970).

1219 Os hospedeiros reservatórios naturais podem apresentar níveis indetectáveis de
1220 anticorpos, com concentrações no soro sanguíneo menores que o amplamente aceito, na
1221 diluição 1/100 (Ellis, 2015; Muthukkaruppan et al., 2007; Sunbul et al., 2001; Vinetz et
1222 al., 1996), devido a adaptação destes animais à infecção de *Leptospira* spp. no decorrer
1223 da evolução de suas espécies (Stritof Majetic et al., 2014). Essa condição pode ter
1224 refletido nos resultados de MAT deste estudo, em que nenhum dos pequenos mamíferos
1225 coletados apresentaram aglutininas anti-leptospiras.

1226 Geralmente as estirpes de referência usadas para o diagnóstico pelo MAT não
1227 contemplam os sorogrupos responsáveis pela infecção dos animais, domésticos e
1228 selvagens, em determinadas áreas. Desta forma a sensibilidade do teste é comprometida,
1229 e se vê necessário isolar as estirpes circulantes naquele ambiente, a fim de aumentar, em
1230 até dez vezes, esta sensibilidade do método diagnóstico (Jorge et al., 2012; Mgode et al.,
1231 2015).

1232 A PCR, no entanto, é uma técnica que corrige parte dessas desvantagens
1233 associadas ao MAT, por ser capaz de distinguir os animais portadores renais de
1234 leptospiras patogênicas a partir da identificação do gene *lipL32* em tecidos e excreções
1235 dos portadores. A PCR tem boa sensibilidade tanto em hospedeiros reservatórios, quanto
1236 naqueles portadores de estirpes não conhecidas. Entretanto, a PCR não identifica o
1237 sorovar infectante, o que impossibilita um estudo epidemiológico mais preciso, visto que
1238 só se pode distinguir as infecções incidentais e não incidentais ao se conhecer qual o
1239 sorovar ou sorogrupos de ocorrência, possibilitando a identificação das fontes de infecção
1240 a partir da associação de cada sorovar/sorogrupos com suas espécies de hospedeiros
1241 mantenedores/reservatórios (Dos Santos Paixão et al., 2014; Faria et al., 2008; Jorge et
1242 al., 2012; Mgode et al., 2015; Vieira et al., 2016).

1243 Existia uma forte hipótese, dada a importância dos roedores sinantrópicos como
1244 reservatório de leptospiras, dos espécimes capturados no ambiente antrópico serem
1245 positivos na PCR (Adler e de la Peña Moctezuma, 2010; Silva, 2014). Entretanto, os três
1246 únicos roedores capturados neste ambiente, pertencentes à espécie *Rattus rattus*, não
1247 estavam reagentes ao MAT nem à PCR. Isso pode ter-se dado pelo número reduzido de
1248 indivíduos capturados dessa espécie, ou pelo fato do ambiente de vida desses animais não
1249 sobrepor ao ambiente de vida das outras espécies estudadas.

1250 Já no ambiente de pasto sujo, que margeava a borda da mata, e que representava
1251 um importante local de interface entre a área de vida das espécies de pequenos mamíferos
1252 selvagens e dos bovinos, dos três roedores capturados (*Calomys* sp.), dois apresentaram
1253 o gene *lipL32* extraído de tecidos renais. Sendo assim esses animais se configuram como
1254 importantes agentes eliminadores de leptospiras nesse ambiente, incrementando o risco
1255 de infecção tanto de bovinos, quanto das demais espécies selvagens ali coabitantes.

1256 Dentre as espécies de pequenos mamíferos não voadores capturados, apenas uma
1257 pertencia à ordem Marsupialia, o *Gracilinanus agilis*. Trata-se de um didelfídeo de
1258 pequeno porte (20-45 g), que foi numericamente mais prevalente como portador renal
1259 (64,29%), quando comparado aos roedores (42,86%). Os *Gracilinanus agilis* são animais
1260 arborícolas (Emmons e Feer, 1997), desta forma foram capturados somente nos ambientes
1261 com formação florestal (mata estacional decidual e semidecidual, e matas ribeirinhas)
1262 com destaque para a mata estacional decidual e semidecidual, em que dos 11 animais
1263 amostrados, oito (72,72%) foram positivos à PCR. Quando avaliado a proporção de
1264 portadores renais entre os *Gracilinanus agilis* capturados na campanha do final da estação
1265 seca, 69,23% dos animais estavam positivos à PCR.

1266 Visto que o risco de infecção depende da ecologia das espécies de hospedeiro,
1267 como área de vida, comportamento de forrageamento e contato com outros animais
1268 (Fornazari et al., 2018), identifica-se o papel de *Gracilinanus agilis* como espécie
1269 selvagem importante na manutenção e circulação de leptospiras patogênicas em
1270 ambientes de mata. Esta espécie apresenta uma dieta mais seletiva (insetívora), por isso
1271 precisam ampliar sua área de forrageamento durante o período seco do ano (escassez de
1272 alimentos), aumentando assim o contato com solo, e com diferentes ambientes. Desta
1273 forma são mais desafiados pelas leptospiras eliminadas por outras espécies animais
1274 (selvagens ou domésticas), com *status* de portadoras renais, em sua área de vida (Bagagli

1275 et al., 1998; Drancourt et al., 2006; Ko et al., 1999; Martins et al., 2006; Ramos, 2007;
1276 Pinheiro et al., 2002; Sarkar et al., 2002).

1277 Nos ambientes de captura florestados e de pasto sujo, notou-se uma ocorrência de
1278 pequenos mamíferos portadores renais de leptospiras patogênicas, com ocorrência entre
1279 os animais de mata estacional decidual e semidecidual (69,23% dos animais), seguida
1280 pelo pasto sujo (66,66%) e matas ribeirinhas (44,44%). Isso confirma o fluxo de
1281 leptospiras patogênicas entre os diferentes ambientes coletados, demonstrando a
1282 importância dos pequenos mamíferos selvagens na manutenção e veiculação deste
1283 patógeno na propriedade estudada, e reforçada pelos resultados do estudo de sorovares
1284 circulantes no ambiente a partir dos bovinos.

1285 Devido à baixa sensibilidade do MAT para identificação de reservatórios naturais
1286 de leptospiras, como os roedores e os marsupiais (Ellis, 2015; Jorge et al., 2012;
1287 Muthukkaruppan et al., 2007; Sunbul et al., 2001; Vinetz et al., 1996), buscou-se detectar
1288 os sorovares e sorogrupo de leptospiras patogênicas circulantes no ambiente de estudo
1289 por meio dos bovinos que ali eram mantidos. Pôde-se verificar uma maior frequência de
1290 bovinos sororreagentes a estirpes isoladas a partir de *Rattus* sp. e *Rattus norvegicus*
1291 (estirpes M10/99, Rato e M36/05), bem como para a cepa padrão dos sorovar
1292 *Icterohaemorrhagiae*, também mantida por pequenos mamíferos (Dos Santos Paixão et
1293 al., 2014; Faria et al., 2008; Yalin et al., 2011). Notou-se também uma considerável
1294 frequência de bovinos reagentes ao sorovar *Tarassovi*, comumente associado aos suínos
1295 no Brasil, tanto pelo diagnóstico sorológico quanto pelo isolamento (Sobestiansky et al.,
1296 1999).

1297 É sabido que animais no mesmo ambiente se infectam mutuamente com seus
1298 sorovares (Esteves et al., 2005; Magajevski et al., 2005), e este fato permite inferir que os
1299 bovinos estão sendo desafiados por sorovares mantidos no ambiente tanto pelos pequenos

1300 mamíferos quanto pelos suínos (Mgode et al., 2015), apesar de não se ter coletado, neste
1301 trabalho, material biológico dos suínos para o diagnóstico de leptospirose. Tal fato pode
1302 ser reforçado ao se comparar os resultados de sorovares mais prevalentes nesta
1303 propriedade em um estudoanterioro, realizado por Moreira et al. (2010), em que 87% do
1304 rebanho estava reagente ao MAT, em um padrão divergente para os sorovares. Em 2010
1305 encontraram-se principalmente bovinos reagentes aos sorovares Wolff (21%), Hardjo
1306 (20%), Brastislava (14,5%), Australis (13,7%) e Tarassovi (9,8%).

1307 Alguns fatores de risco estão comprovadamente associados à leptospirose bovina,
1308 entre elas estão a criação conjunta ou promíscua de bovinos e suínos, o contato de
1309 roedores com alimentos dos bovinos (paiol, cochos, etc.), a presença de roedores e/ou
1310 animais selvagens no mesmo ambiente, e a dessedentação a partir de água de rio e
1311 cacimbas, que pode aumentar em 4,43 vezes a chance de infecção em comparação a uma
1312 fonte de água clorada (Agampodi et al., 2014; Draghi et al., 2011; Fávero et al., 2017;
1313 Lilenbaum e Souza, 2003; Mclean et al., 2014; Petrakovsky et al., 2014; Schoonman e
1314 Swai, 2010).

1315 Outro fator de risco de fundamental importância para infecção de bovinos neste
1316 trabalho, foi a idade. Em que a frequência de bovinos com idade superior a 24 meses e
1317 sororreagentes ao MAT (97,87%) foi significativamente maior que frequência encontrada
1318 nos bovinos abaixo de 24 meses de idade (73,68). Esse fator pode estar associado à
1319 maturidade sexual do rebanho, sendo maior a chance de ocorrência da infecção em
1320 bovinos no início da atividade reprodutiva, bem como o maior tempo de exposição ao
1321 ambiente contaminado, e às próprias fontes de infecção da doença (Cortese, 2009;
1322 Guimarães, 2017). Entretanto, pode-se observar que mesmo com essas condições de
1323 anteparo aos animais mais jovens contra a leptospirose, a frequência de sororreagentes

1324 entre os bovinos abaixo dos 24 meses de idade ainda foi bastante alta, indicando um alto
1325 grau de desafio a que todo rebanho estava sendo submetido.

1326 Em pesquisa sobre a manutenção de leptospiras no ambiente, Thibeaux et al.
1327 (2017) identificaram o solo como um reservatório ambiental de leptospiras patogênicas,
1328 mantendo-as viáveis por até quatro meses, em sua própria atmosfera protetora.
1329 Principalmente em solos superficiais, em profundidades de 1 a 5 cm, e em faixas de 1 m
1330 de distância do limite da lâmina d'água de rios e riachos. Bovinos, suínos e pequenos
1331 mamíferos desta pesquisa tinham acesso à agua do ribeirão da propriedade estudada,
1332 logicamente com o solo adjacente. Desta forma acredita-se que este ambiente seja uma
1333 interface essencial para a circulação de leptospiras patogênicas entre todas as espécies
1334 domésticas e selvagens ali encontradas.

1335 É importante ressaltar que o ribeirão era a principal fonte de água para
1336 dessedentação e equilíbrio térmico dos suínos, e que o excedente da água utilizada por
1337 esses animais retornava ao curso d'água. Os bovinos também utilizam da água do ribeirão
1338 para hidratação, sendo assim, verifica-se um contato destes animais com água
1339 contaminada pela urina daqueles.

1340 *Nectomys squamipes* são ratos semiaquáticos, conhecidos como rato-d'água, e
1341 pela característica de seu ambiente de vida, os mesmos se tornam mais suscetíveis ao
1342 contato com água contaminada por urina de outros animais portadores renais, aumentando
1343 o risco de infecção. Também constituem uma importante interface entre os ambientes
1344 aquático e terrestre, promovendo a circulação de leptospiras patogênicas entre os dois
1345 ecossistemas (Bonvicino et al., 2008; Cordeiro et al., 1981; Emmons e Feer, 1997; Fávero
1346 et al., 2017; Ko et al., 1999; Martins et al., 2006; Pinheiro et al., 2002; Ramos, 2007;
1347 Sarkar et al., 2002)

1348 Dentre os oito bovinos que apresentaram maior titulação (800), seis mostraram
1349 maior concentração de aglutininas para sorovares do sorogrupo Icterohaemorrhagiae
1350 (cinco Icterohaemorrhagiae e um Copenhageni M10/99), um bovino para o sorogrupo
1351 Sejroe (sorovar Guaricura), e um para o sorogrupo Tarassovi (sorovar Tarassovi). O
1352 sorogrupo Icterohaemorrhagiae está intimamente associado a seus reservatórios roedores
1353 e gambás, tanto no meio urbano como no meio rural (Duhamel et al., 1998; Esteves et al.,
1354 2005; Ko et al., 1999; Langoni et al., 2008; Lilenbaum et al., 1993; Pereira et al., 2005;
1355 Silva, 1976). Esse é um sorogrupo que provoca infecção incidental em bovinos, ou seja,
1356 para haver a infecção nesses ruminantes, necessita-se de um ambiente contaminado pela
1357 urina de seus reservatórios. Sendo assim, no ambiente estudado, reforça-se o papel dos
1358 pequenos mamíferos na manutenção e veiculação de leptospiras patogênicas.

1359 O sorogrupo Sejroe está adaptado aos bovinos, e a transmissão se dá
1360 principalmente pelo contato direto entre indivíduos dessa mesma espécie (Ellis, 2015).
1361 Entretanto, mesmo com medidas clássicas de controle e profilaxia, bovinos adoecem com
1362 leptospirose. A identificação de baixos índices reprodutivos, muita das vezes leva ao
1363 diagnóstico presuntivo, sendo confirmado por uma alta soroprevalência (MAT) para
1364 sorovares não frequentes na espécie bovina (Moreira et al., 2010). No presente estudo, a
1365 frequência de animais sororreagentes para sorovares do sorogrupo Sejroe foi
1366 numericamente menor que para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae. Adicionalmente,
1367 sabendo que a frequência de animais com títulos de 800 para o sorogrupo Tarassovi,
1368 associados a suínos (Sobestiansky et al., 1999) foi igual para o sorogrupo Sejroe. Desta
1369 forma reitera-se que os pequenos mamíferos são agentes de destaque na epidemiologia
1370 da leptospirose na área estudada.

1371 Na área pesquisada verifica-se a composição de um mosaico entre áreas de
1372 pastagens e matas (deciduais, semi deciduais e ribeirinhas) a que os bovinos tinham livre

1373 acesso (Figura 1). É sabido que a presença do gado dentro de fragmentos florestais
1374 amplifica os efeitos de borda, produzindo um fenômeno que altera a estrutura da
1375 vegetação, compacta o solo, favorece a proliferação de espécies selvagens oportunistas e
1376 generalistas, resultando por sua vez na proliferação e dispersão de patógenos mantidos
1377 por essas espécies favorecidas no ambiente (Daszak et al., 2004; Primack e Rodrigues,
1378 2001; Rivero, 2016).

1379 Esta realidade somente foi possível pela ação antrópica, que ao alterar o ambiente
1380 promove o desequilíbrio da tríade epidemiológica, induzindo a ocorrência de
1381 leptospirose. Os seres humanos são hospedeiros acidentais, não adaptados a qualquer
1382 sorovar, e por isso apresentam vigorosa suscetibilidade à infecção por *Leptospira* spp.
1383 (Faine et al., 1999; Ko et al., 2009). Existem evidências que sorogrupos mantidos por
1384 roedores selvagens são correlatos aos de prevalência sorológica na leptospirose humana
1385 (Mgode et al., 2015; Silva, 2014; Stritof Majetic et al., 2014).

1386 Ao se criar ambientes em desequilíbrio ecológico, e ao se identificar diferentes
1387 espécies de mamíferos portadores renais de um mesmo sorovar, o favorecimento da
1388 infecção em humanos é constatado (Mgode et al., 2015). Dessa forma, sabendo-se que
1389 53,57% dos pequenos mamíferos eram portadores renais de leptospires patogênicas, e que
1390 65,15% dos bovinos deste estudo estavam reagentes ao MAT para pelo menos uma das
1391 estirpes do sorovar Copenhageni, ou mesmo para o sorovar Icterohaemorrhagiae,
1392 intensamente patogênicos para humanos, identificou-se um notável risco ocupacional
1393 para leptospirose na propriedade estudada.

1394 Dentre as sete espécies de pequenos mamíferos não voadores que foram
1395 capturadas, todas as espécies selvagens foram identificadas como portadoras renais de
1396 leptospires patogênicas. Isso demonstra a ampla variedade de hospedeiros para
1397 *Leptospira* spp., e que este patógeno está bem adaptado a uma série de diferentes espécies

1398 de pequenos mamíferos selvagens em ambiente de ecótono Cerrado-Mata Atlântica
1399 (Obiegala et al., 2016). Espécies domésticas, como suínos e bovinos, também são
1400 considerados importantes reservatórios de leptospiras patogênicas, principalmente
1401 associados aos riscos de infecção humana. A exposição a criações peridomésticas de
1402 bovinos e suínos com altas prevalências para leptospirose (caso do rebanho bovino deste
1403 estudo) representa um dos principais fatores de risco para leptospirose humana (Barragan
1404 et al., 2016).

1405 Além do risco ocupacional da leptospirose (para magarefes, médicos veterinários,
1406 tratadores, proprietários rurais, técnicos de irrigação, etc.), outro importante fator de risco
1407 associado aos casos de leptospirose humana é o risco recreacional, pelo contato humano
1408 com água e ambientes contaminados durante atividades desportivas e de lazer junto a
1409 matas e cursos d'água (Guernier et al., 2017; Mgode et al., 2015; Obiegala et al., 2016;
1410 Thibeaux et al., 2017). Visto que a água e o solo são importantes ambientes de
1411 manutenção de leptospiras patogênicas (Ellis, 2015; Thibeaux et al., 2017).

1412 Em casos de patógenos que infectam mais de uma espécie hospedeira, a população
1413 da espécie hospedeira mais resistente será favorecida, em detrimento daquelas espécies
1414 em que o patógeno é mais virulento (Hudson, Dobson, Lafferty, 2006), logo, espera-se
1415 que a população de pequenos mamíferos não voadores seja favorecida em ambientes com
1416 *Leptospira* circulante. O que fortalece a hipótese de que os pequenos mamíferos não
1417 voadores, marsupiais e roedores, desempenhem relevante papel na ecologia da
1418 leptospirose na propriedade estudada.

1419 A transmissão de *Leptospira* também é favorecida em casos de alta densidade de
1420 hospedeiros, e em geral, qualquer introdução de novas espécies hospedeiras aumenta a
1421 transmissão deste patógeno, devido a intensificação do contato entre os indivíduos dentro
1422 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 leptospiras patogênicas. Pequenos
1428 mamíferos não voadores se confirmaram como importantes vias de manutenção e
1429 circulação de leptospiras patogênicas no ambiente estudado.

1430

1431

1432

1433

1434

1435

1436

1437

1438

1439

1440

1441

1442

1443

1444

1445

1446

1447

1448 **Referências Bibliográficas**

- 1449 Adler, B., de la Peña Moctezuma, A., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140, 287–296. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012
- 1450 Agampodi, S.B., Karunaratna, D., Jayathilala, N., Rathnayaka, H., Agampodi, T.C., Karunayanayaka, 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
- 1451 Agência Nacional de Águas, 2013. Plano de Recursos Hídricos e do Enquadramento dos Corpos Hídricos Superficiais da Bacia Hidrográfica do Rio Paranaíba.
- 1452 Akande, O.A., 2011. A study on wild rat behaviour and control on a pig farm. *Swedish University of Agricultural Sciences.*
- 1453 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
- 1454 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
- 1455 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 (*Dasyurus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 505–512. doi:10.4269/ajtmh.1998.58.505
- 1456 Barragan, V., Chiriboga, J., Miller, E., Olivas, S., Birdsall, 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
- 1457 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
- 1458 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.
- 1459 Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2013. Guia brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais. Brasília.
- 1460 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.
- 1461 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.
- 1462 Corrêa, S.H.R., 2007. Leptospirose, in: Roca (Ed.), *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. São Paulo, pp. 736–741.
- 1463 Cortese, V.S., 2009. Neonatal Immunology. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* doi:10.1016/j.cvfa.2008.10.003
- 1464 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., Athanazio, 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
 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 Lilienbaum, 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 Lilienbaum, 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)00114-0
- 1595 Magajevski, F.S., Silva Girio, R.J., Mathias, L.A., Myashiro, S., Genovez, M.É.,

- 1597 Scarcelli, E.P., 2005. Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls
 1598 serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. Brazilian J.
 1599 Microbiol. 36, 43–47. doi:10.1590/S1517-83822005000100009
- 1600 Martins, E.G., Bonato, V., Pinheiro, A., dos Reis, S.F., 2006. Variation in the food-
 1601 niche width of *Gracilinanus microtarsus* (Didelphimorphia: Didelphidae) in a
 1602 cerrado remnant in south-eastern Brazil. Mamm. Biol. 71, 304–308.
 1603 doi:10.1016/j.mambio.2006.03.001
- 1604 McCallum, H., Barlow, M., Hone, J. 2001. How should pathogen transmission be
 1605 modelled? TREE, 16, 295–300.
- 1606 Mclean, M., Ruscoe, Q., Kline, T., King, C., Nesdale, A., 2014. A cluster of three cases
 1607 of leptospirosis in dairy farm workers in New Zealand. N. Z. Med. J. 127, 13–20.
- 1608 Mgode, G.F., Machang'u, R.S., Mhamphi, G.G., Katakweba, A., Mulungu, L.S.,
 1609 Durnez, L., Leirs, H., Hartskeerl, R.A., Belmain, S.R., 2015. *Leptospira* Serovars
 1610 for Diagnosis of Leptospirosis in Humans and Animals in Africa: Common
 1611 Leptospira Isolates and Reservoir Hosts. PLoS Negl. Trop. Dis. 9.
 1612 doi:10.1371/journal.pntd.0004251
- 1613 Miller, R.S., Farnsworth, M.L., Malmberg, J.L., 2013. Diseases at the livestock-wildlife
 1614 interface: Status, challenges, and opportunities in the United States. Prev. Vet.
 1615 Med. 110, 119–132. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.11.021
- 1616 Mittermeier, R.A., Myers, N., Mittermeier, C.G., Robles, G., 1999. Hotspots: Earth's
 1617 biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX, SA,
 1618 Agrupación Sierra Madre, SC.
- 1619 Moreira, R.Q., Cabral, D.D., Lima, A.M.C., Oliveira, P.R., 2010. Soroprevalência de
 1620 anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Leptospira interrogans* em duas
 1621 propriedades de vacas leiteiras com relatos de prejuízos reprodutivos no município
 1622 de Goiandira, Goiás. Ciência Anim. Bras. 11, 396–401.
- 1623 Muthukkaruppan, V., Hartskeerl, R., Priya, C., Hoogendijk, K., Berg, M., Rathinam, S.,
 1624 Ahmed, A., 2007. Field rats form a major infection source of leptospirosis in and
 1625 around Madurai, India. J. Postgrad. Med. 53, 236. doi:10.4103/0022-3859.37511
- 1626 Nakamura, I., Hang-Ombe, B.M., Sawa, H., Kobayashi, S., Orba, Y., Ishii, A., Thomas,
 1627 Y., Isozumi, R., Yoshimatsu, K., Mweene, A.S., Takada, A., Sugimoto, C.,
 1628 Arikawa, J., 2013. Cross-Reactivity of Secondary Antibodies against African
 1629 Rodents and Application for Sero-Surveillance. J. Vet. Med. Sci. 75, 819–825.
 1630 doi:10.1292/jvms.12-0471
- 1631 Obiegala, A., Woll, D., Karnath, C., Silaghi, C., Schex, S., Eßbauer, S., Pfeffer, M.,
 1632 2016. Prevalence and Genotype Allocation of Pathogenic *Leptospira* Species in
 1633 Small Mammals from Various Habitat Types in Germany. PLoS Negl. Trop. Dis.
 1634 10. doi:10.1371/journal.pntd.0004501
- 1635 Oliveira-Filho, A.T., Ratter, J.A., 2002. Vegetation Physiognomies and Wood Flora of
 1636 the Cerrado Biome, in: The Cerrados of Brazil. pp. 91–120. doi:10.1663/0013-
 1637 0001(2003)057[0656:DFABRE]2.0.CO;2
- 1638 Pereira, M.M., Pereira Da Silva, J.J., Pinto, M.A., Da Silva, M.F., Machado, M.P.,
 1639 Lenzi, H.L., Marchevsky, R.S., 2005. Experimental leptospirosis in marmoset
 1640 monkeys (*Callithrix jacchus*): A new model for studies of severe pulmonary
 1641 leptospirosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 72, 13–20. doi:72/1/13 [pii]
- 1642 Petrakovský, J., Bianchi, A., Fisun, H., Nájera-Aguilar, P., Pereira, M.M., 2014. Animal
 1643 leptospirosis in Latin America and the caribbean countries: Reported outbreaks and
 1644 literature review (2002–2014). Int. J. Environ. Res. Public Health.
 1645 doi:10.3390/ijerph111010770
- 1646 Pinheiro, F., Diniz, I.R., Coelho, D., Bandeira, M.P.S., 2002. Seasonal pattern of insect

- 1647 abundance in the Brazilian cerrado. *Austral Ecol.* 27, 132–136. doi:10.1046/j.1442-
1648 9993.2002.01165.x
- 1649 Primack, R.B., Rodrigues, E., 2001. *Biologia da conservação*, Editora Planta.
1650 doi:10.4257/oeco.2009.1303.01
- 1651 R Development Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical
1652 Computing. R Found. Stat. Comput. Vienna Austria 0, {ISBN} 3-900051-07-0.
1653 doi:10.1038/sj.hdy.6800737
- 1654 Ramos, V.D.N., 2007. Ecologia alimentar de pequenos mamíferos de áreas de cerrado
1655 no sudeste do Brasil. (2007), 68.f. *Ecol. Aliment. pequenos mamíferos áreas*
1656 cerrado no sudeste do Bras. Mestr. em Ecol. e Conserv. Recur. Naturais. Univ.
1657 Fed. Uberlândia, Uberlândia.
- 1658 Reilly, J.R., 1970. The susceptibility of five species of wild animals to experimental
1659 infection with *Leptospira grippotyphosa*. *J. Wildl. Dis.* 6, 289–294.
1660 doi:10.7589/0090-3558-6.4.289
- 1661 Sarkar, U., Nascimento, S.F., Barbosa, R., Martins, R., Nuevo, H., Kalafanos, I.,
1662 Grunstein, I., Flannery, B., Dias, J., Riley, L.W., Reis, M.G., Ko, A.I., 2002.
1663 Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during
1664 an urban epidemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 605–610.
1665 doi:10.4269/ajtmh.2002.66.605
- 1666 Schoonman, L., Swai, E.S., 2010. Herd- and animal-level risk factors for bovine
1667 leptospirosis in Tanga region of Tanzania. *Trop. Anim. Health Prod.* 42, 1565–
1668 1572. doi:10.1007/s11250-010-9607-1
- 1669 Silva, I., 1976. A new leptospiral serotype isolated in Salvador, Bahia state. *Rev.*
1670 *Microbiol.* 7, 35–37.
- 1671 Silva, F.J. da, 2014. Epidemiologia da infecção por *Leptospira* spp. em áreas rurais nos
1672 biomas brasileiros.
- 1673 Sobestiansky, J., Barcellos, D., Mores, N., Carvalho, L.F., Oliveira, S., 1999. *Clínica e*
1674 *patologia suína*, 2ed ed. Goiânia.
- 1675 Stoddard, R.A., Gee, J.E., Wilkins, P.P., McCaustland, K., Hoffmaster, A.R., 2009.
1676 Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain
1677 reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64, 247–255.
1678 doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014
- 1679 Stritof Majetic, Z., Galloway, R., Ruzic Sabljic, E., Milas, Z., Mojce Perko, V., Habus,
1680 J., Margaletic, J., Pernar, R., Turk, N., 2014. Epizootiological survey of small
1681 mammals as *Leptospira* spp. reservoirs in Eastern Croatia. *Acta Trop.* 131, 111–
1682 116. doi:10.1016/j.actatropica.2013.12.009
- 1683 Sunbul, M., Esen, S., Leblebicioglu, H., Hokelek, M., Pekbay, A., Eroglu, C., 2001.
1684 *Rattus norvegicus* acting as reservoir of *leptospira interrogans* in the Middle Black
1685 Sea region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to
1686 *Leptospira* strain. *Scand. J. Infect. Dis.* 33, 896–898.
1687 doi:10.1080/00365540110076796
- 1688 Thibeaux, R., Geroult, S., Benezech, C., Chabaud, S., Soupé-Gilbert, M.E., Girault, D.,
1689 Bierque, E., Goarant, C., 2017. Seeking the environmental source of Leptospirosis
1690 reveals durable bacterial viability in river soils. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11.
1691 doi:10.1371/journal.pntd.0005414
- 1692 Thiermann, A.B., 1980. Canine leptospirosis in Detroit. *Am. J. Vet. Res.* 41, 1659–
1693 1661.
- 1694 Thrusfield, M., 2010. *Veterinary epidemiology*. Blackwell Publishing, Oxford.
- 1695 Vieira, A.S., Narduche, L., Martins, G., Schabib Péres, I.A.H.F., Zimmermann, N.P.,
1696 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
ecótono impactada por atividades agropecuárias (Short Communication)**

1731

1732

1733

1734

1735

1736

1737

1738

1739

1740

1741

1742 **Carrapatos de pequenos mamíferos do vale do rio Paranaíba, uma região de
1743 ecótono impactada por atividades agropecuárias (*Short Communication*)**

1744

1745 **Resumo**

1746 O rio Paranaíba está localizado predominantemente no bioma Cerrado, e a área de sua
1747 bacia detém pouco mais de 20% de vegetação nativa. Os pequenos mamíferos são
1748 modelos aplicáveis no estudo de carrapatos e circulação de patógenos, inclusive em
1749 ambientes com diferentes graus de degradação. Diante disso, teve-se por objetivo avaliar
1750 o papel desses animais como hospedeiros para carrapatos em áreas de Cerrado com
1751 diferentes características de fragmentação no vale do rio Paranaíba (regiões do Alto,
1752 Médio e Baixo Paranaíba). Foram capturados 72 espécimes de pequenos mamíferos
1753 pertencentes a três gêneros de marsupiais (*Micoureus*, n = 4; *Gracilinanus*, n = 34; e
1754 *Didelphis*, n = 1) e oito de roedores (*Akodon* n = 3; *Calomys*, n = 4; *Necromys*, n = 4;
1755 *Cerradomys*, n = 4; *Hylaeamys*, n = 4; *Nectomys*, n = 3; *Oecomys*, n = 10; *Rhipidomys*, n
1756 = 1; *Mus*, n = 1; e *Rattus*, n = 3). Destes, apenas 14 animais, correspondentes a cinco
1757 gêneros (*Nectomys*, *Cerradomys*, *Oecomys*, *Necromys* e *Gracilinanus*) estavam
1758 infestados por carrapatos. A maior prevalência de animais infestados foi no período seco
1759 do ano (21,16%; 11/52), enquanto no período chuvoso a prevalência foi de 15% (3/20).
1760 A riqueza de carrapatos foi de pelo menos 04 espécies no Alto Paranaíba (*Ixodes* sp.,
1761 *Ornithodoros* sp., *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma sculptum*) além de larvas de
1762 *Amblyomma* sp.; 02 no Médio Paranaíba (*Ornithodoros* sp. e *Amblyomma dubitatum*), e
1763 larvas de *Amblyomma* sp.; e apenas 01 no Baixo Paranaíba (*Ornithodoros* sp.). Carrapatos
1764 do gênero *Ornithodoros* sp. foram encontrados parasitando apenas o didelfídeo
1765 *Gracilinanus* sp. O carrapato da espécie *Amblyomma dubitatum* foi o de maior ocorrência
1766 em pequenos mamíferos do vale do rio Paranaíba, e este parece ser o primeiro registro
1767 desta espécie em *Nectomys* sp. no bioma Cerrado. Como também o primeiro registo 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 Carapatos 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 carapatos 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.

1793 A Bacia do Rio Paranaíba está inserida no bioma Cerrado, e apresenta áreas com
1794 manchas características de Mata Atlântica. Em função de atividades antrópicas, em
1795 apenas 21,8% da área total ainda resta vegetação nativa (ANA, 2013). Nesse sentido, sua
1796 localização e importância econômica tornam a sua área vulnerável e sujeita a forte e
1797 constante perda de habitat, o que pode favorecer algumas espécies em detrimento de
1798 outras (Andren, 1994; Bender et al., 1998; Bennett, 1990; Brooks et al., 2002; Buchmann
1799 et al., 2013; Johnstone e Reina, 2014; Schlinkert et al., 2016).

1800 Alguns dos grupos de pequenos mamíferos não voadores, importantes
1801 hospedeiros de formas imaturas de carrapatos, e o grupo dos carrapatos, como o
1802 *Amblyomma sculptum*, são favorecidos por esses efeitos antropogênicos, como a perda de
1803 áreas florestadas, apresentando aumento de suas populações (Galvão et al., 2005; Szabó
1804 et al., 2013). Diante disso, objetivou-se, por meio deste trabalho, avaliar o papel de
1805 pequenos mamíferos não voadores como hospedeiros para carrapatos em áreas de
1806 Cerrado com diferentes características de fragmentação no vale do Rio Paranaíba, nos
1807 estados de Minas Gerais e Goiás.

1808

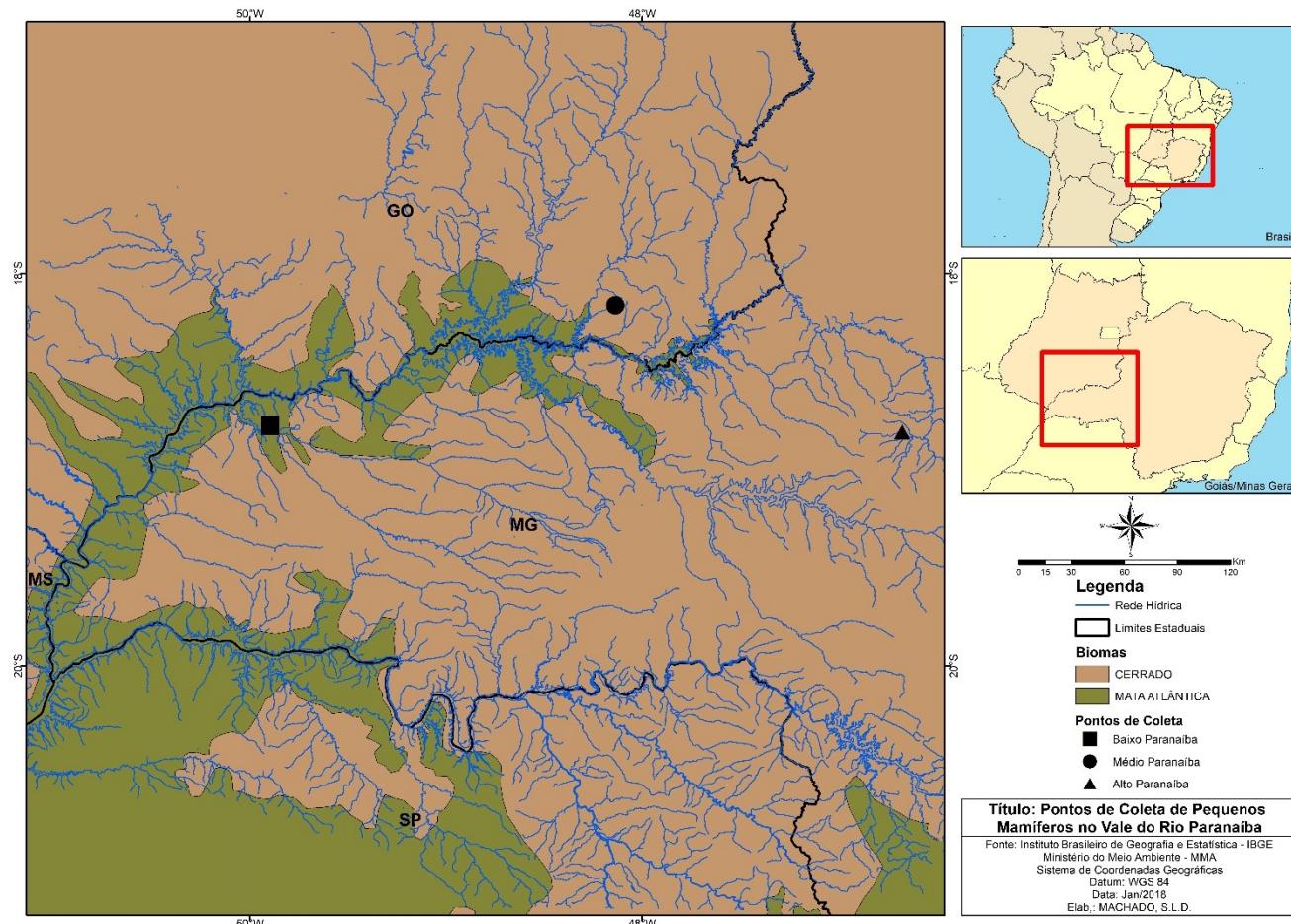
1809 **Material e Métodos**

1810 *Área de estudo*

1811 O estudo foi conduzido em áreas rurais de três municípios ao longo do vale do rio
1812 Paranaíba, todos impactados pela atividade agropecuária. Se fez a distinção entre as
1813 matrizes de cada área conforme o tipo de atividade agropecuária, e as característica da
1814 vegetação remanescente. Área 1- Alto Paranaíba (Guimarânia, Minas Gerais,
1815 18,8101944S; 46,6755278W); matriz composta por culturas comerciais de inhame
1816 (*Dioscorea alata*), soja (*Glycine max*), milho (*Zea mays*) e eucalipto (*Eucalyptus sp.*),
1817 com faixas de matas conectadas (Cerrado e Mata Atlântica – região de ecótono)

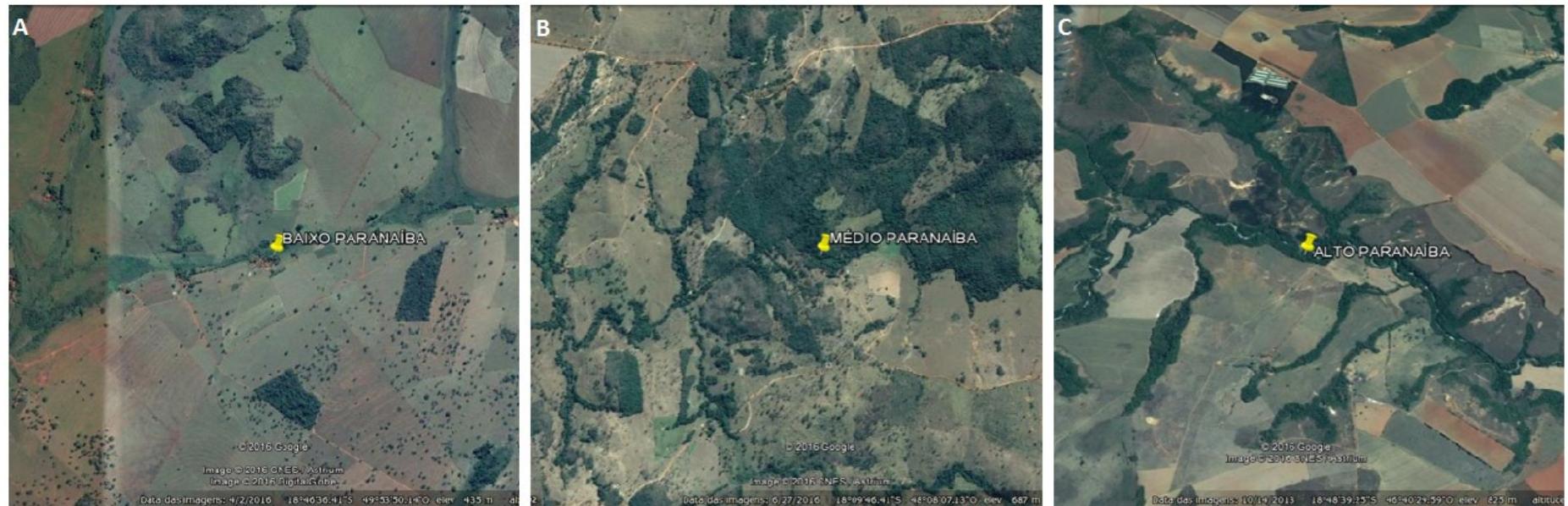
1818 margeando corpos de água. Área 2 – Médio Paranaíba (Goiandira, Goiás, 18,1630556S;
1819 48,1354722W): matriz composta por pastagens com fragmentos de matas (Cerrado e
1820 Mata Atlântica – região de ecótono); Área 3 – Baixo Paranaíba (Ipiaçu, Minas Gerais,
1821 18,7770833S; 49,8978889W): predominância 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 semideciduais ou deciduais 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) Ipiaçu-MG (Baixo Paranaíba), B) Goiandira-
1840 GO (Médio Paranaíba), C) Guimarânia-MG (Alto Paranaíba), 2016.

1841 Fonte: Google Earth

1842

1843

1844

1845 *Captura de pequenos mamíferos*

1846 Em cada um dos três sítios de estudo, duas campanhas foram conduzidas para
1847 captura de pequenos mamíferos, sendo a primeira no final da estação úmida (março-abril
1848 de 2016) e uma no final da seca (setembro de 2016). Foram utilizadas armadilhas dos
1849 modeloss *Sherman* e *Tomahawk*, iscadas com rodelas de banana cobertas por farelo de
1850 paçoca (Limongi et al., 2016; Ramirez, 2017; Ramos, 2013). Para captura de roedores
1851 sinantrópicos foram utilizadas, em média, oito armadilhas tipo *Sherman* colocadas em
1852 variados pontos considerados propícios. Para ambientes de matas decíduas e
1853 semidecíduas e de mata de galeria, 50 armadilhas tipo *Sherman* foram montadas em cada
1854 uma das duas fisionomias, dispostas em linhas com estações de captura a cada dez metros,
1855 sendo uma armadilha instalada sobre o solo e outra sobre uma árvore em cada estação.
1856 No ambiente de pasto sujo, oito armadilhas tipo *Tomahawk*, e oito tipo *Sherman* foram
1857 colocadas linearmente sobre o solo, com espaço de dez metros entre cada uma delas.

1858 Todas as armadilhas foram inspecionadas diariamente pela manhã, tendo a isca
1859 trocada a cada 48 horas ou reposta quando necessário. Em todos ambientes e áreas, foram
1860 conduzidas quatro noites de capturas por campanha, totalizando um esforço de 2.976
1861 armadilhas-noite durante o estudo.

1862 Os animais capturados foram anestesiados com a associação de cloridrato de
1863 tiletamina 250mg com cloridrato de zolazepan 250mg na dose de 0,1mL/Kg pela via
1864 intramuscular (Silva, 2014) para biometria, sexagem e coleta de carapatos. As fêmeas
1865 prenhas e em amamentação foram acondicionadas em sacos de algodão até o retorno
1866 completo da anestesia, e posteriormente soltas nos seus respectivos locais de captura. Os
1867 demais espécimes foram eutanasiados por exsanguinação intracardíaca (Conselho Federal
1868 de Medicina Veterinária, 2013; CONCEA, 2013). Os procedimentos foram autorizados
1869 pelo Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (Protocolo 52983/1) e pela

1870 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia
1871 sob número de protocolo 151/16.

1872

1873 *Coleta e identificação de carapatos*

1874 Toda a superfície corporal dos pequenos mamíferos foi completamente
1875 inspecionada à procura de carapatos. Os carapatos não alimentados foram preservados
1876 em isopropanol e aqueles ingurgitados foram mantidos vivos para completar ecdise (em
1877 estufas tipo B.O.D., a 85% de umidade e 27°C). Adicionalmente, carapatos do ambiente
1878 foram coletados através de arraste de flanela (Oliveira et al., 2000), por conveniência, e
1879 pela inspeção da roupa e corpo dos pesquisadores. A identificação taxonômica foi feita
1880 sob lupa estereoscópica com auxílio de chaves de identificação (Martins et al., 2010;
1881 Onófrio et al., 2006) e comparação com coleção de referência (Coleção de Carapatos da
1882 Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais). A identificação de larvas de
1883 *Amblyomma* e *Ornithodoros* foram restrinidas ao gênero, as demais, assim como ninfas
1884 e adultos foram identificados em espécies.

1885

1886 *Análises*

1887 A prevalência, (número de hospedeiros infestados/número total de hospedeiros
1888 capturados), a intensidade média de infestaçao (número total de carapatos/número de
1889 hospedeiros infestados) (Bush et al., 1997) e a mediana de carapatos por hospedeiros
1890 foram calculados. Áreas e ambientes foram comparados pelo teste de medianas de Mood
1891 (intensidade mediana) e exato de Fisher ou Qui-quadrado (prevalências), usando o
1892 programa *Quantitative Parasitology* (Reiczigel e Rózsa, 2005). A taxa total de captura
1893 (número de hospedeiros capturados/esforço de captura) foi calculada para cada área de
1894 estudo (1, 2 e 3) e para os diferentes ambientes (pasto sujo, ambiente antrópico e matas).

1895 **Resultados**

1896 Setenta e dois espécimes de pequenos mamíferos não voadores foram capturados.
1897 Destes, três espécies de marsupiais didelfídeos (*Micoureus*, n = 4; *Gracilinanus*, n = 34;
1898 e *Didelphis*, n = 1) e oito roedores cricetídeos e murídeos (*Calomys*, n = 4; *Akodon*, n =
1899 3; *Cerradomys*, n = 4; *Hylaeamys*, n = 4; *Nectomys*, n = 3; *Rhipidomys*, n = 1; *Oecomys*,
1900 n = 10; *Mus*, n = 1; e *Rattus*, n = 3). Apenas 14 indivíduos estavam infestados por
1901 carrapatos (Tabela 1).

1902 A taxa de captura foi maior na estação seca, assim como os níveis de infestação
1903 do hospedeiro por carapato. Na estação úmida, dos 20 animais capturados, apenas três
1904 apresentaram carrapatos. Na estação úmida, 20 animais foram capturados, e apenas três
1905 estavam infestados (uma ninfa de *Amblyomma dubitatum* e 38 larvas de *Amblyomma* sp.).
1906 Em ambas formações florestadas, (matas ribeirinhas e matas decíduas e semi decíduas)
1907 apresentaram o carrapato argasídeo *Ornithodoros*, mas nos hospedeiros de matas
1908 ribeirinhas foram identificadas apenas duas espécies de *Amblyomma*. De modo geral, a
1909 prevalência ($p = 0,266$) e a intensidade mediana de infestação ($p = 0,835$) forma similares
1910 nos dois ambientes de matas.

1911 O número de pequenos mamíferos não voadores capturados foi semelhante nas
1912 três áreas de estudo (27 na área 3, 28 na Área 2 e 17 na Área 1). Os ambientes de matas,
1913 no total e por área, apresentaram uma maior taxa de captura (1,8%). A prevalência ($p =$
1914 0,228) e a intensidade mediana de infestação ($p = 0,767$) também foram similares entre
1915 as áreas 1, 2 e 3. Considerando todas as espécies de carrapatos, a Área 1 apresentou
1916 25,92% de prevalência, e uma intensidade média de 4,0 carrapatos por hospedeiro. A
1917 Área 2 apresentou 21,43% e 1,5 carrapatos por hospedeiros, e a Área 3, 5,88% e 1,0
1918 carrapato por hospedeiro.

1919 Carapatos 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 c.f. 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 c.f. 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 Registrhou-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.

1955 O carapato mais abundantemente coletado em estágios não parasitários foi *A.*
1956 *sculptum*, mas apenas um espécime foi observado sobre um roedor (*Rhipidomys* sp.). No
1957 entanto, essa única ninfa de *A. sculptum* não estava ingurgitada e nem fixada ao corpo do
1958 roedor. Esta espécie de carapato já foi relatada parasitando *Cerradomys*, *Gracilinanus* e
1959 *Micoureus* no bioma Cerrado (Saraiva et al., 2012) e no Pantanal, em *Thrichomys* e
1960 *Monodelphis* (Ramos, 2013). É preciso salientar, porém, que de forma semelhante ao
1961 nosso estudo, esses relatos se referem a baixos níveis de infestação, e quando a
1962 informação é mencionada, os carapatos não estavam fixados ou ingurgitados, reforçando
1963 a hipótese de falta de afinidade entre pequenos mamíferos e *A. sculptum*.

1964 *Amblyomma dubitatum* ocorreu em maior número nos pequenos mamíferos, mas
1965 a prevalência foi semelhante às outras espécies de carapatos. Os três estágios de *A.*
1966 *dubitatum* (larvas, ninfas e adultos) são encontradas parasitando capivaras (*Hydrochoerus*
1967 *hydrochaerys*) (Aragão, 1936; Nava et al., 2010), e as fases de vida livre estão associadas
1968 a áreas úmidas (Debárbora et al., 2014; Nava et al., 2010; Queirogas et al., 2012; Szabó
1969 et al., 2007). É notada uma coincidência no ambiente de vida de capivaras e *Nectomys*
1970 *squamipes*, o que pode justificar a quantidade de *A. dubitatum* parasitando este pequeno
1971 mamífero.

1972 Além de se encontrar *A. dubitatum* em *Nectomys squamipes*, pôde-se registrar o
1973 mesmo parasitismo em *Akodon* sp. nas Áreas 1 e 2. *N. squamipes* já foi observado sendo
1974 parasitado por *A. dubitatum* em área Mata Atlântica do Nordeste do Brasil (Dantas-Torres
1975 et al., 2010), mas ainda não existem relatos desta relação hospedeiro-carapato em áreas
1976 do Cerrado. Para o *Akodon* sp., esta associação já foi descrita para algumas espécies do
1977 gênero (Debárbora et al., 2012; Ramirez, 2017), mas não no bioma Cerrado

1978 Larvas de *Ixodes loricatus* foram encontradas infestando *N. squamipes*,
1979 *Cerradomys* sp. e *Rhipidomys* sp. A associação entre *Nectomys* e *Ixodes* tem sido

1980 recorrente no Brasil (Labruna et al., 2003; Onofrio et al., 2013; Saraiva et al., 2012a;
1981 Ramirez, 2017, Lamattina et al., 2018). Em áreas de Cerrado, entretanto, e para *I.*
1982 *loricatus*, o parasitismo é mais frequente em outros pequenos mamíferos, como *Didelphis*
1983 *albiventris* e *Oecomys* sp. (Pascoli, 2014; Coelho et al., 2016). Neste estudo, todos os três
1984 gêneros de hospedeiros infestados por *I. loricatus* foram capturados na floresta ribeirinha
1985 da Área 1. Isso pode implicar em alguma especificidade ambiental desse carapato,
1986 porque em outros biomas, e também no Cerrado, *Ixodes* também são frequentemente
1987 relatados em ambientes florestais (Arzua et al., 2003; Barros-Battesti et al., 2000; Díaz et
1988 al., 2009; Luz et al., 2013; Pascoli, 2014; Martins et al., 2014; Coelho et al., 2016;
1989 Ramirez, 2017). Para o parasitismo de *Rhipidomys* sp. por *Ixodes*, existe apenas um relato
1990 na Venezuela (Durden e Keirans, 1994), e para a relação de *I. loricatus* e *Cerradomys*
1991 parece ser esse o primeiro relato.

1992 O marsupial didelfídeo *Gracilinanus agilis* foi infestado unicamente por
1993 *Ornithodoros* sp., em todas as três áreas de captura, demonstrando um parasitismo não
1994 ocasional. Como já foi observado, *G. agilis* e outras espécies arbóreas já foram relatadas
1995 infestadas por *Ornithodoros mimon* no Cerrado e Pantanal (Ramos, 2013; Martins et al.,
1996 2014; Sponchiado et al., 2015). Este carapato é um argasídeo, e muitas espécies desta
1997 família apresentam hábitos nidícolas, realizando seu ciclo de vida no abrigo do hospedeiro
1998 (Balashov, 1972, Sonenshine et al., 2002). Algumas espécies de *Ornithodoros* que
1999 parasitam morcegos, são encontrados dentro dos buracos das árvores utilizados por seus
2000 hospedeiros (Muñoz-Leal et al., 2016). *G. agilis* é um marsupial arbóreo, e o local de
2001 infestação por *Ornithodoros* pode estar associado a este tipo de abrigo.

2002 No bioma Cerrado, em áreas não pertencentes a unidades de conservação, a
2003 vegetação original é restrita a pequenos fragmentos, e imersos em paisagens agrícolas, e
2004 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 registo 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

2055 **Referências**

- 2056
- 2057 Andren, H., 1994. Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes
2058 with different proportions of suitable habitat: a review. *Oikos*, 355-366.
- 2059
- 2060 Agencia Nacional de Águas (ANA), 2013. Plano de Recursos Hídricos e do Enquadramento
2061 dos Corpos Hídricos Superficiais da Bacia Hidrográfica do Rio Paranaíba. 312p. ISBN: 978-85-
2062 8210-020-2
- 2063
- 2064 Aragão HB. 1936. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitropes. *Mem Inst. Oswaldo
2065 Cruz.* 31, 759-841.
- 2066
- 2067 Arzua, M., Da Silva, M.A.N., Famadas, K.M., Beati, L., Barros-Battesti, D.M., 2003.
2068 *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari: Ixodidae) on birds in southern
2069 Brazil, with notes on their ecology. *Experimental & Appl. Acarol.* 31, 283-296.
- 2070
- 2071 Balashov, Y.S., 1972. Bloodsucking ticks (Ixodidae), vectors of disease of man and
2072 animals. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 8, 163-376.
- 2073
- 2074 Barros-Battesti, D.M., Yoshinari, N.H., Bonoldi, V.L.N., de Castro Gomes, A., 2000.
2075 Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *I. loricatus* (Acari: Ixodidae) on small wild
2076 mammals from an Atlantic Forest in the State of São Paulo, Brazil. *J. Med. Entomology.* 37, 820-827.
- 2077
- 2078
- 2079 Bender, D.J., Contreras, T.A., Fahrig, L., 1998. Habitat loss and population decline: a
2080 meta-analysis of the patch size effect. *Ecology.* 79, 517-533.
- 2081
- 2082 Bennett, A.F., 1990. Habitat corridors and the conservation of small mammals in a
2083 fragmented forest environment. *Landsc. Ecology.* 4, 109-122.
- 2084
- 2085 Brooks, T.M., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A., Rylands, A.B.,
2086 Konstant, W.R., Hilton-Taylor, C., 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of
2087 biodiversity. *Conservation biology.* 16, 909-923.
- 2088
- 2089 Brownstein, J.S., Holford, T.R., Fish, D., 2003. A climate-based model predicts the spatial
2090 distribution of the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in the United States. *Environ.
2091 Health Perspect.* 111, 1152-1157.
- 2092
- 2093 Buchmann, C.M., Schurr, F.M., Nathan, R., Jeltsch, F., 2013. Habitat loss and
2094 fragmentation affecting mammal and bird communities - The role of interspecific
2095 competition and individual space use. *Ecological Informatics.* 14, 90-98.
- 2096
- 2097 Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology
2098 on its own terms: Margolis et al. revisited. *The J. Parasitol.* 575-583.
- 2099
- 2100 Cleaveland, S., Laurenson, M.K., Taylor, L.H., 2001. Diseases of humans and their
2101 domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence.
2102 *Philos. Trans. R. Society B.* 356, 991-999.
- 2103

- 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. 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 Debárbara, V.N., Mangold, A.J., Eberhardt, A., Guglielmone, A.A., Nava, S., 2014.
 2120 Natural infestation of *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Amblyomma dubitatum* ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 63, 285-294.
- 2122
- 2123 Debárbara, 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. *Climatología*. 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, redescriptions, 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., Mastropaoletti, 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., Giacomin, 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. *Carapatos 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 Paraná, 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. Carapatos e riquétsias 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., Drobnick, 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 carapatos 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 carapatos 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 Tscharntke, 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

- 2303 Thorner, A.R., Walker, D.H., Petri Jr, W.A., 1998. Rocky Mountain spotted fever. Clin.
2304 Infect. Dis. 27, 1353-1359.
- 2305
- 2306 Vieira, M.V., 1997. Dynamics of a rodent assemblage in a Cerrado of southeast
2307 Brazil. Revista Bras. Biologia. 57, 99-107.
- 2308
- 2309 Wimberly, M.C., Yabsley, M.J., Baer, A.D., Dugan, V.G., Davidson, W.R., 2008. Spatial
2310 heterogeneity of climate and land-cover constraints on distributions of tick-borne
2311 pathogens. Glob. Ecol. Biogeogr. 17, 189-202.
- 2312
- 2313
- 2314
- 2315
- 2316
- 2317
- 2318
- 2319
- 2320
- 2321
- 2322
- 2323
- 2324
- 2325
- 2326
- 2327
- 2328
- 2329
- 2330
- 2331
- 2332
- 2333
- 2334
- 2335
- 2336
- 2337
- 2338
- 2339
- 2340
- 2341
- 2342
- 2343
- 2344
- 2345
- 2346
- 2347
- 2348
- 2349
- 2350
- 2351
- 2352

2353 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2354
2355 As propriedades rurais no Brasil, em sua maioria, não apresentam grande emprego
2356 de tecnologia em seus sistemas de produção, principalmente na atividade pecuária.
2357 Geralmente não possuem assessoria medico-veterinária de forma continua, e gerenciam
2358 suas empresas de modo empírico e intuitivo. Muitas das vezes os proprietários se
2359 organizam a partir de demandas dos órgãos regulatórios e fiscalizadores do estado, para
2360 conseguirem assegurar a comercialização de seus produtos.

2361 A leptospirose é uma importante zoonose, porém não é uma doença de controle
2362 oficial em animais, junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
2363 (MAPA) brasileiro, nem aos órgãos estaduais de defesa sanitária animal. É uma
2364 bacteriose de curso crônico em bovinos, causando principalmente prejuízos
2365 imperceptíveis àquelas propriedades que não praticam controle zootécnico, com emprego
2366 adequado de tecnologia. Por isso, muita das vezes a leptospirose em criações extensivas
2367 é negligenciada pelo proprietário, e até mesmos pelos profissionais médicos veterinários.

2368 *Leptospira* spp. é uma bactéria mantida no ambiente pelos animais portadores
2369 renais, muita das vezes assintomáticos. Infecta uma grande série de espécies domésticas
2370 e selvagens, e já foi descrito o diagnóstico, por técnicas diretas e indiretas, nos mamíferos,
2371 peixes, aves e répteis. Geralmente, ao se suspeitar da ocorrência desta doença em uma
2372 propriedade, a preocupação técnica se recala sobre a principal espécie comercial ali
2373 existente, e não se dá a importância devida ao ambiente, e às espécies comunicantes que
2374 possibilitam a manutenção das leptospires viáveis para a infecção e reinfecção.

2375 Pequenos mamíferos não voadores são um grupo de espécies que podem
2376 apresentar crescimento de suas populações em ambientes onde se tenha algum grau de
2377 antropização. Assim eles se tornam uma boa ferramenta para identificação de patógenos,
2378 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 leptospires patogênicas,
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 leptospires 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 leptospires patogênicas 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 leptospires. 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 leptospiras 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 zoonoóticos
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 reinfeção 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抗ígenos 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 leptospiras patogênicas 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, deciduais 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

2477 no rio Grande, fronteira ao extremo oeste do Triângulo Mineiro, possibilitaram o
2478 conhecimento *in locu* das condições de produção de pequenas, médias e grandes
2479 propriedades rurais. Foi possível conhecer o impacto social, ambiental e econômico das
2480 atividades agropecuárias características de cada região. Como a influência das pequenas
2481 propriedades leiteiras na região do Alto Paranaíba, mantenedoras do Patrimônio Cultural
2482 Imaterial Brasileiro: o queijo. Que a partir do controle de origem deste produto (Canastra,
2483 Serra do Salitre, Região do Cerrado, Pratinha, entre outros) mantiveram boa parte da
2484 população rural no campo, reforçou-se a tradição desta manufatura, adequou a produção
2485 a padrões higiênico-sanitários internacionais, manteve a circulação local da renda, e
2486 possibilitou a oferta de um produto de qualidade ao consumo humano. E segundo dados
2487 da Agencia Nacional de Águas, é nessa parte da bacia do rio Paranaíba que se tem o maior
2488 índice de preservação das vegetações naturais de Mata Atlântica e Cerrado.

2489 Na região do Médio Paranaíba foi possível reconhecer um ambiente misto de
2490 produção, com propriedades de pequenas a médias, associando gado de corte e gado
2491 leiteiro, porém com produtividade menor, e menor emprego de tecnologia. E o Baixo
2492 Paranaíba, que passa por um processo de substituição da bovinocultura pela cultura da
2493 cana-de-açúcar. Fato tão lamentado pelos antigos agricultores e pecuaristas, na maioria
2494 pequenos proprietários, que confessaram a necessidade de arrendar suas terras para as
2495 usinas de açúcar e álcool. E em consequência dessa substituição da atividade produtiva,
2496 relataram a forte diminuição da circulação local da renda, afetando os setores de comércio
2497 e serviços, e consequentemente a qualidade do emprego e da renda das famílias. Desta
2498 forma, algumas delas foram obrigadas a migrar do campo para as cidades, e das pequenas
2499 cidades para aquelas maiores. Como relataram os produtores de Itaguaçu, distrito do
2500 município de São Simão, no estado de Goiás, e de Ipiaçu 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.