

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Animais de interesse em saúde: Biologia animal**

Nicole Almeida dos Reis

**Pequenos mamíferos como hospedeiros e reservatórios de Hantavírus em
uma área periurbana de Mata Atlântica**

São Paulo

2023

Nicole Almeida dos Reis

**Pequenos mamíferos como hospedeiros e reservatórios de Hantavírus em uma
área periurbana de Mata Atlântica**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Saúde do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Animais de interesse em Saúde: Biologia animal.

Orientador (a): Dra. Erika Hingst-Zaher

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Reis, Nicole Almeida dos

Pequenos mamíferos como hospedeiros e reservatórios de Hantavírus em uma área periurbana de Mata Atlântica / Nicole Almeida dos Reis ; orientador(a) Erika Hingst-Zaher - São Paulo, 2023.

52 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal.

1. Biodiversidade 2. Fragmentação. 3. Região periurbana. 4. Zoonose I. Hingst-Zaher, Erika. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Nicole Almeida dos Reis, aluno(a) do Curso de Especialização em Saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 31 de Janeiro de 2023

Nicole A. Reis

Aluno(a): Nicole Almeida dos Reis



De acordo:
Orientador(a): Dra. Erika Hingst-Zaher

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Butantan e à Escola Superior do Instituto Butantan, pela oportunidade de estar realizando esta especialização.

A minha orientadora Dra. Erika Hingst-Zaher, pela oportunidade e orientação, por todo apoio e pelos ensinamentos.

Ao PREVIR, pelo auxílio financeiro e pela oportunidade de estar participando desse grande projeto.

A equipe do MBIOLAB, em especial ao Gabriel Lins e a Amanda Silva, por todo o acolhimento, auxílios e pelas amizades.

Ao LVCM e seus pesquisadores, em especial a Ma. Amanda Viana, Isabela Assis, Dr. Luciano Thomazelli, Prof. Dr. Jansen de Araujo, Prof. Dr. Edson Durigon e Dra. Danielle Bruna Durigon, pelo acolhimento, ensinamentos e auxílio nas atividades laboratoriais.

Aos donos e gestores do Sítio Piraquara, em especial ao Thomas Kunze e ao Quecinho, por ceder o espaço para a pesquisa, pela recepção e por todo o apoio durante as atividades de campo.

A equipe de campo, em especial ao Irineu Cunha, Ana Carolina Pallante e a Gislaine Carneiro, por todo o ensinamento e auxílio em campo.

A minha turma de especialização, pelos momentos vividos, pelas amizades, por todo o incentivo nessa jornada e pelas longas tardes no Bar do Pirata.

A minha família, em especial aos meus pais, Sofia de Almeida e Renato Reis, e ao meu namorado, Thiago Wittner, por todo o apoio e encorajamento até aqui.

Aos meus amigos, em especial Kauan Garcia, Luciana Silva e Thaliane Barbosa, por todo o apoio e conselhos.

Aos meus gatos: Pantera, Dunga, Gatinha, Priscila, Josevaldo, Ana Júlia, Jane, Magnólia e Gatão, por sempre estarem do meu lado.

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

É interessante contemplar uma ribanceira cheia de vegetação, com plantas de muitas espécies, pássaros cantando nos arbustos, com muitos insetos voando e vermes se arrastando pela terra úmida e refletir que essas formas elaboradamente construídas, tão diferentes umas das outras e mutuamente dependentes de maneira tão complexa, foram produzidas por leis que atuam à nossa volta.

Charles Darwin, A origem das espécies

RESUMO

REIS, Nicole. **Pequenos mamíferos como hospedeiros e reservatórios de Hantavírus em uma área periurbana de Mata Atlântica**. 2023. 52p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Saúde) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Os mamíferos executam papéis fundamentais nas dinâmicas dos ecossistemas, protagonizando diferentes serviços ecossistêmicos. Dentre os mamíferos das florestas de regiões neotropicais, os pequenos mamíferos formam um dos grupos ecológicos mais diversificados. A estrutura da paisagem reflete no deslocamento de indivíduos, alterando a densidade de diferentes populações de animais, influenciando na taxa de transmissão de patógenos entre estes animais, e também entre humanos. Os pequenos mamíferos são potenciais hospedeiros e/ou reservatórios de vírus que podem ocasionar doenças zoonóticas. Dentre as zoonoses emergentes, em que o ciclo de transmissão está relacionado a esses animais, as hantavirose são uma das mais importantes. Dados da literatura sugerem que a taxa de detecção viral em animais silvestres tende a ser maior em áreas degradadas do que em áreas preservadas. Comparou-se dados coletados em uma área de região periurbana com a literatura científica de análises semelhantes. Foram realizadas duas campanhas de campo para a captura de pequenos mamíferos terrestres. Para a detecção de Hantavírus, foram coletadas e analisadas amostras de *swabs* orais e retais dos espécimes capturados, e também foram analisadas amostras de *swabs* coletados anteriormente em quirópteros no mesmo local em 2021. Das 86 amostras de pequenos mamíferos analisadas por qPCR e por PCR convencional, todas foram negativas para Hantavírus. A não detecção de Hantavírus nos pequenos mamíferos amostrados no local de estudo não exclui a possibilidade de presença deste vírus nesses animais na área amostrada e também na região em que essa área se encontra, visto que este vírus já foi encontrado em regiões próximas. Não foi possível averiguar se a hipótese, de que a incidência de Hantavírus em pequenos mamíferos tende a ser maior em regiões degradadas do que em regiões preservadas, é verdadeira. É necessário que haja um monitoramento contínuo, em pequenos mamíferos e também em outros animais silvestres, para que se tenha um controle viral eficaz e também para antecipar o surgimento de novos vírus de origem zoonótica.

Palavras-chaves: Biodiversidade. Fragmentação. Região periurbana. Zoonose.

ABSTRACT

REIS, Nicole. **Small mammals as hosts and reservoirs of Hantavirus in a peri-urban area of the Atlantic Forest.** 2023. 52p. Completion of course work (Specialization in Health) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Mammals play key roles in the dynamics of ecosystems, performing different ecosystem services. Among the forest mammals of neotropical regions, small mammals form one of the most diverse ecological groups. The landscape structure reflects on the displacement of individuals, changing the density of different populations of animals, influencing the transmission rate of pathogens between these animals, and also between humans. Small mammals are potential hosts and/or reservoirs of viruses that can cause zoonotic diseases. Among emerging zoonoses, in which the transmission cycle is related to these animals, hantaviruses are one of the most important. Literature data suggest that the viral detection rate in wild animals tends to be higher in degraded areas than in preserved areas. Data collected in a peri-urban area was compared with the scientific literature of similar analyses. Two field campaigns were carried out to capture small terrestrial mammals. For the detection of Hantavirus, oral and rectal swab samples were collected and analyzed from the captured specimens, and swab samples previously collected from chiroptera in the same location in 2021 were also analyzed. Of the 86 samples of small mammals analyzed by qPCR and by conventional PCR, all were negative for Hantavirus. The non-detection of Hantavirus in the small mammals sampled at the study site does not exclude the possibility of the presence of this virus in these animals in the sampled area and also in the region where this area is located, since this virus has already been found in nearby regions. It was not possible to verify if the hypothesis, that the incidence of Hantavirus in small mammals tends to be higher in degraded regions than in preserved regions, is true. It is necessary to have continuous monitoring, in small mammals and also in other wild animals, in order to have effective viral control and also to anticipate the emergence of new viruses of zoonotic origin.

Keywords: Biodiversity. Fragmentation. Periurban region. Zoonosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Área de estudo, localizada em São Lourenço da Serra	20
Figura 2 - Pontos de captura dos pequenos mamíferos terrestres.	21
Figura 3 - Curva de dissociação, dos produtos qPCR para Hantavírus, por SYBR-Green	28
Figura 4 - Eletroforese em gel de Agarose[2%], corado com brometo de etídeo, dos produtos de qPCR para Hantavírus.....	28
Figura 5 - Eletroforese em gel de Agarose[2%], corado com brometo de etídeo, dos produtos de PCR para Hantavírus.....	31
Figura 6 - Sequenciamento do controle positivo	34
Figura 7 - Sequenciamento da amostra 128 A.....	34
Figura 8 - Sequenciamento da amostra 132.....	35
Figura 9 - Sequenciamento da amostra 134.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Local de estudo	19
3.2 Métodos de captura e coleta de amostras	20
3.3 Processamento das amostras e análise de dados	22
3.3.1 Pequenos mamíferos terrestres	22
3.3.2 Morcegos.....	23
4 RESULTADOS	27
4.1 Pequenos mamíferos terrestres	27
4.2 Morcegos	30
5 DISCUSSÃO	37
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE	45

1 INTRODUÇÃO

O Brasil abriga uma das maiores diversidades de espécies do mundo, sendo considerado um país megadiverso (ICM BIO, 2018). Os mamíferos, por exemplo, contam com 770 espécies distribuídas em 11 ordens, 51 famílias e 247 gêneros. (ABREU-JR. *et al.*, 2021). Esses animais executam papéis fundamentais nas dinâmicas dos ecossistemas, contribuindo diretamente para o fluxo de energia entre os níveis tróficos, protagonizando diferentes serviços ecossistêmicos. Eles podem atuar como predadores de topo, presas, polinizadores, dispersores de sementes, sendo responsáveis, por exemplo, pela manutenção e crescimento de vegetação. Estes serviços ambientais são essenciais para a manutenção da biodiversidade (GALETTI *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2009).

Dentre os mamíferos das florestas de regiões neotropicais, espécies de pequenos mamíferos formam um dos grupos ecológicos mais diversificado, representando 80% da riqueza desta mastofauna (BOVENDORP *et al.*, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2018; PAGLIA *et al.*, 2012; UMETSU; PARDINI, 2007). Estão inseridos nessa categoria aqueles que atingem massa corporal de até dois quilos quando adultos, e que são capturados com o uso redes de neblina e armadilhas de contenção (LOPES; MENDES-OLIVEIRA, 2015; PAGLIA *et al.*, 2012). Essa classificação abrange os mamíferos voadores, morcegos representantes da ordem Chiroptera, e mamíferos terrestres, com espécies de marsupiais, pertencentes à ordem Didelphimorphia, e espécies de roedores, pertencentes à ordem Rodentia (ABREU-JR. *et al.*, 2021; DELGADO, 2017; LOPES; MENDES-OLIVEIRA, 2015).

Juntas, essas ordens compreendem grande parte da riqueza de espécies de mamíferos do Brasil, a ordem Rodentia abrange 267 espécies, Chiroptera apresenta 181 espécies e Didelphimorphia possui 67 espécies reconhecidas (ABREU-JR *et al.*, 2021). Em relação aos morcegos, a subordem Microchiroptera é a que possui representantes no Brasil e também que se enquadra na categoria de pequenos mamíferos voadores (REIS *et al.*, 2007). Dentre os pequenos mamíferos não voadores, os roedores que fazem parte desse grupo pertencem às famílias Echimyidae e Cricetidae. Em relação aos marsupiais, estes animais estão reunidos em apenas uma família, Didelphidae, sendo a subfamília Didelphinae a principal representante da categoria de pequenos mamíferos terrestres da ordem Didelphimorphia (ABREU-JR. *et al.*, 2021).

Apesar destes animais possuírem origens evolutivas diferentes, eles estão reunidos nesta classificação devido às suas características morfológicas, como o tamanho, e suas características comportamentais (LOPES; MENDES-OLIVEIRA, 2015; PAPI *et al.*, 2020). Os pequenos mamíferos possuem comportamento secreto, hábitos noturnos e crepusculares, influenciam nas dinâmicas florestais e podem ser bons indicadores de alterações locais do habitat em que estão inseridos (PAPI *et al.*, 2020; UMETSU; PARDINI, 2007). Os pequenos mamíferos terrestres atuam na polinização, predação e dispersão de sementes, na predação de plântulas e na dispersão de fungos micorrízicos, sendo bons indicadores de alterações locais devido à especificidade destes animais com o uso de microhabitats. Os pequenos mamíferos voadores podem realizar dispersão de sementes, polinização, controle de populações de insetos e pequenos vertebrados, e fertilizar o solo através de suas fezes, que são ricas em nitrogênio. Devido a todas estas características, estes animais possuem grande complexidade biológica e importância ecológica (ALLOCATI *et al.*, 2016; PARDINI; UMETSU, 2006; REIS *et al.*, 2007; UMETSU; PARDINI, 2007).

As dinâmicas florestais, influenciadas positivamente pelos pequenos mamíferos, passam por drásticas mudanças devido às constantes supressões em paisagens naturais que são ocasionadas por ações antrópicas (DELGADO, 2017). Uma das alterações antrópicas de grande impacto sobre os ecossistemas é a fragmentação de habitats, fazendo com que áreas inicialmente contínuas se transformem em mosaicos, denominados de ilhas de habitats. Esta alteração no habitat também está associada à perda de funções essenciais dos ecossistemas (ELLWANGER *et al.*, 2022; PASSAMANI, 2003). Atualmente, a Mata Atlântica é representada por fragmentos dispersos ao longo da costa brasileira, sendo o conjunto de biomas brasileiro mais afetado por ações antrópicas. Este contínuo florestal se estendia, no passado, do sudeste do Rio Grande do Norte ao sudeste do Rio Grande do Sul, mas devido ao desmatamento intensivo sua área original foi reduzida e atualmente restam cerca de 12,4%, sendo considerado um hotspots de biodiversidade (AB'SÁBER, 2003; COUTINHO, 2016; SOS MATA ATLÂNTICA, 2021).

O conjunto florestal de Mata Atlântica é uma das regiões de floresta neotropical com a maior diversidade e endemismo de mamíferos do mundo, possuindo 338 espécies distribuídas em 157 gêneros. Devido a estas alterações antrópicas no meio ambiente, o habitat de diferentes espécies de animais silvestres está diminuindo, afetando seus nichos ecológicos e estreitando o contato entre esses animais e

humanos. Esses acontecimentos podem refletir na emergência ou reemergência de doenças zoonóticas (CORRÊA *et al.*, 2013; BRANDÃO; HINGST-ZAHER, 2021; ELLWANGER *et al.*, 2022; PINTO *et al.*, 2009; PRIST; D'ANDREA; METZGER, 2017). As áreas periurbanas surgem acerca disso, são definidas como regiões de transição onde a urbanização e fragmentos florestais se conectam. As extensões florestais que resistem aos processos antrópicos podem se tornar potenciais reservatórios de doenças (ARAUJO *et al.*, 2012; PEREIRA, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A expansão de atividades humanas e o reflexo dessas ações resultam também na disseminação de espécies de pequenos mamíferos generalistas em fragmentos florestais neotropicais (UMETSU; PARDINI, 2007). Essas espécies, diferente das espécies especialistas, apresentam grande diversidade em seus habitats e nichos ecológicos, tendem a ocupar habitats modificados e possuem uma maior capacidade de dispersão, sendo adaptadas a transitar entre ambientes urbanos e florestais. Este fato pode aumentar a probabilidade de disseminação de doenças zoonóticas, pois essas espécies podem se tornar importantes reservatórios de diversos patógenos, que podem causar doenças infecciosas em humanos (KRUSE *et al.*, 2004; OWEN *et al.*, 2010). A estrutura do habitat, relacionada com a precipitação e conseqüentemente com a disponibilidade de alimentos, refletem na dinâmica de indivíduos, podendo alterar a densidade de diferentes populações de animais, influenciando na taxa de transmissão de diferentes patógenos entre esses animais assim como em humanos, podendo levar a emergência de doenças (ARAUJO *et al.*, 2012; KRUSE *et al.*, 2004; LANGLOIS *et al.*, 2001).

Zoonoses são doenças infecciosas que se propagam entre animais silvestres e humanos. Muitos animais são reservatórios de diferentes patógenos como vírus, bactérias, fungos e outros parasitas. Estes animais podem não apresentar sintomas, podendo surgir somente quando estes patógenos atingem os humanos (CRISÓSTOMO, 2018). Este fato pode ocorrer devido ao processo de transbordamento, “*spillover*”, que ocorre quando um reservatório, com uma alta prevalência de um determinado patógeno, entra em contato com uma nova população hospedeira. O *spillover* zoonótico é caracterizado pela transferência de patógenos entre diferentes espécies de animais, que podem resultar em novas doenças infecciosas, se as condições forem favoráveis à adaptação do patógeno na nova população (ELLWANGER *et al.*, 2022; POWER; MITCHELL, 2004). A maioria dos patógenos que atualmente afetam os seres humanos são derivados de

microrganismos que anteriormente circulavam apenas em animais não humanos. A emergência ou reemergência de doenças de origem zoonótica estão, em grande parte, relacionadas aos mamíferos, pelo fato de que esses animais são mais próximos filogeneticamente aos humanos, e os processos de transbordamento dos patógenos desses animais para os humanos podem ocorrer mais facilmente. Os pequenos mamíferos são potenciais hospedeiros e/ou reservatórios de vírus que podem ocasionar doenças zoonóticas (GALETTI *et al.*, 2010; BAUERFEIND *et al.*, 2016; ELLWANGER *et al.*, 2022; KRUGER *et al.*, 2015; KRUSE *et al.*, 2004; UMETSU; PARDINI, 2007; WOOLHOUSE *et al.*, 2012). As ações humanas no meio ambiente e o modo como o homem se relaciona com os animais silvestres, pode influenciar no risco de transbordamento, de *spillover* (ELLWANGER *et al.*, 2022; KRUSE *et al.*, 2004).

Dentre as zoonoses emergentes, em que o ciclo de transmissão está relacionado a pequenos mamíferos, as hantavirose são uma das mais importantes no Brasil. Essas zoonoses são um grave problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (ARAÚJO *et al.*, 2012; KRUGER *et al.*, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). As infecções por Hantavírus foram reconhecidas pela primeira vez durante a Guerra da Coréia, quando diversos soldados desenvolveram uma síndrome composta por febre hemorrágica e insuficiência renal. As hantavirose podem apresentar diferentes quadros clínicos e o primeiro caso de hantavirose no Brasil ocorreu em São Paulo, no ano de 1993 (KOEHLER *et al.*, 2022; PRIST *et al.*, 2017). No período de 2010 a 2020 foram notificados 15.080 casos suspeitos, desses, 996 foram confirmados e 414 evoluíram para óbito. A taxa de letalidade em média é de 41,5%, sendo a maior taxa de letalidade relacionada a outros países da América do Sul, como Chile, Argentina e Paraguai (KOEHLER *et al.*, 2022; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; PRIST *et al.*, 2016).

Hantavírus são vírus pertencentes à família *Hantaviridae*, da ordem *Bunyavirales*, subdivididos em quatro subfamílias, sete gêneros e cinquenta e três espécies (ICTV, 2021). Das quatro subfamílias, *Mammantavirinae* é a subfamília de hospedeiros e reservatórios mamíferos. Essa subfamília compreende quatro gêneros, sendo o *Orthohantavírus* o gênero que pode causar doenças graves e letais em humanos, como a Febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR) e a Síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavírus (SPCVH), essa última é a patologia mais incidente na América do Sul e no Brasil (ALLOCATI, *et al.* 2016; ARAI; YANAGIHARA,

2020; GUTERRES *et al.*, 2018; KOEHLER *et al.*, 2022; KRUGER *et al.*, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; PRIST *et al.*, 2017). A família *Hantaviridae* apresenta vírus envelopados e de forma esférica, constituídos por um genoma de RNA tripartido de fita simples e sentido negativo, seus três segmentos: pequeno (S), médio (M) e grande (G), codificam respectivamente: a proteína do nucleocapsídeo (NP), uma poliproteína que quando clivada gera duas glicoproteínas do envelope (Gn, Gc) e uma polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) (ARAI; YANAGIHARA, 2020; ARAUJO, 2010; GUTERRES *et al.*, 2018; KOEHLER *et al.*, 2022; SABINO-SANTOS JR., 2015).

Esses Hantavírus são conhecidos como robovirose, vírus que são transmitidos por espécies de pequenos roedores. Esses animais são os hospedeiros naturais e os reservatórios do *Orthohantavírus*, mas há uma ampla gama de outros pequenos mamíferos hospedeiros, como os marsupiais e morcegos, que podem se tornar potenciais reservatórios (ALLOCATI *et al.*, 2016; ARAUJO *et al.*, 2012; SABINO-SANTOS JR., 2015; SCHMALJOHN; HJELLE, 1997). Os morcegos, por exemplo, possuem características únicas para lidar com infecções por patógenos intracelulares, e esses animais hospedam mais vírus zoonóticos por espécie do que os roedores. A presença de *Orthohantavírus* em marsupiais e morcegos já foi relatada e a transmissão desse Hantavírus entre essas diferentes espécies pode ocorrer devido ao contato e à sobreposição de nichos ecológicos (ARAUJO *et al.*, 2012; BROOK; DOBSON, 2015; CALISHER *et al.*, 2006; GUTERRES *et al.*, 2018; REIS *et al.*, 2007; SABINO-SANTOS JR., 2015). Morcegos e Roedores são consideradas espécies com alto potencial zoonótico, e as modificações antrópicas, no meio em que estão inseridos, que facilitam o contato humano com estes animais, estão associadas ao aumento de riscos por infecções zoonóticas (ELLWANGER *et al.*, 2022).

A transmissão de Hantavírus, de seu reservatório para os humanos, pode ocorrer por via respiratória, a partir da inalação de partículas virais presentes em urina e fezes contaminadas, através da ingestão de alimentos parcialmente comido por animais infectados, pela ingestão da carne do animal infectado ou pela mordida do animal (ALLOCATI *et al.*, 2016; ARAUJO *et al.*, 2012; CRISÓSTOMO, 2018; KOEHLER *et al.*, 2022; KRUGER *et al.*, 2015; PRIST *et al.*, 2016). Alterações antropogênicas no meio ambiente estão relacionadas ao aumento na abundância de espécies reservatórios de Hantavírus, e na prevalência desse vírus em áreas tropicais. As características do habitat, a relação entre a paisagem e o clima, juntamente com

fatores sociais, podem promover ou restringir a prevalência de Hantavírus em seus reservatórios e hospedeiros, e estão associados com a transmissão desses vírus para humanos (OWEN *et al.*, 2010; PRIST *et al.*, 2016; PRIST; D'ANDREA; METZGER, 2017).

Na América Latina há duas linhagens de *Orthohantavírus* dominantes que estão associadas à Síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavírus (SPCVH, sendo elas: Andes vírus (ANDV) e Sin nombre (SNV). No Brasil, existem cerca de sete linhagens de *Orthohantavírus* associadas à SPCVH que podem estar associadas a municípios em que os diferentes sorotipos foram detectados, sendo elas: Anajatuba (ANJV), Araraquara (ARQV), Castelo dos Sonhos (CASV), Juquitiba (JUQV), Laguna Negra (LANV), Paranoá (PARV) e Rio Mamoré (RIOMV). E duas linhagens nos municípios de Rio Mearim e Jaborá associadas apenas a roedores, até o momento (JUNIOR *et al.*, 2020; KOEHLER *et al.*, 2022; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; SABINO-SANTOS JR., 2015).

Dentre os Hantavírus citados, Donalísio e Peterson (2011) concluíram que o tipo JUQV é dominante em áreas florestais das regiões Sudeste e Sul da Mata Atlântica. Embora ocorra sobreposição geográfica e consequentes co-circulações, o vírus ARQV é o patógeno dominante no Cerrado, enquanto o JUQV é dominante na Mata Atlântica (ARAUJO *et al.*, 2015; GUTERRES *et al.*, 2018; PRIST *et al.*, 2016). Essas regiões também abrigam uma grande diversidade dos roedores da subfamília Sigmodontinae, que possui gêneros generalistas e abundantes na natureza associados com a SPCVH, sendo eles: Akodon, Bolomys, Calomys, Necromys e Oligoryzomys. Existem altos níveis de relação entre os reservatórios naturais e as diferentes filogenias de Hantavírus, cada linhagem de *Orthohantavírus*, na maioria das vezes está associada a uma espécie de roedor específico. Para cada região brasileira existem diferentes espécies de reservatórios que hospedam diferentes cepas de vírus, podendo haver também co-circulações em simpatria em diferentes espécies de reservatório (ARAUJO *et al.*, 2015; DONALÍSIO; PETERSON, 2011; GUTERRES *et al.*, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; OWEN *et al.*, 2010; SCHMALJOHN; HJELLE, 1997; SUZUKI *et al.*, 2004).

É importante conhecer a ecologia desses animais para entender seus papéis como hospedeiros e reservatórios desses patógenos e a dinâmica de transmissão viral. Grande parte das doenças emergentes em humanos é causada por vírus zoonóticos e os pequenos mamíferos são potenciais reservatórios naturais de vírus

(ALLOCATI *et al.*, 2016; GALETTI *et al.*, 2010; UMETSU; PARDINI, 2007; WOOLHOUSE *et al.*, 2012). A emergência ou reemergência de doenças zoonóticas está, em grande parte, relacionada com fatores socioeconômicos e ambientais. Os casos de infecções por Hantavírus em humanos são um grave problema em áreas desmatadas e conseqüentemente ocupadas (ALLOCATI *et al.*, 2016; ARAUJO *et al.*, 2012; GALETTI *et al.*, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O transbordamento de um vírus de origem zoonótica só vem à tona quando ocorrem mortes de humanos e de outros animais em grandes quantidades. Levantamentos sobre a história natural de vírus e de seus hospedeiros naturais são métodos importantes para prever o surgimento de doenças emergentes (BROOK; DOBSON, 2015; SABINO-SANTOS JR., 2015). Embora um número crescente de SPCVH venha sendo diagnosticado no Brasil, desde a primeira descrição, ainda há muito a se conhecer sobre os possíveis reservatórios de Hantavírus (CRISÓSTOMO, 2018; DELGADO, 2017). É necessário estudar Hantavírus em diferentes espécies e realizar estratégias de vigilância e monitoramento, principalmente onde estes animais e os humanos estão em contato próximo (ALLOCATI *et al.*, 2016; ARAUJO *et al.*, 2012; UMETSU; PARDINI, 2007). Dados da literatura sugerem que a taxa de detecção de vírus em animais silvestres tende a ser maior em regiões degradadas do que em regiões preservadas (ARAUJO *et al.*, 2012; CORRÊA *et al.*, 2013; ELLWANGER *et al.*, 2022; KOEHLER *et al.*, 2022; KRUGER *et al.*, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; PRIST *et al.*, 2016; PRIST *et al.*, 2021). Com isso, comparou-se dados coletados em uma área de região periurbana com a literatura científica de análises semelhantes.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste projeto foi analisar a incidência de Hantavírus em marsupiais, roedores e quirópteros de uma área de região periurbana, e comparar com resultados vigentes de análises semelhantes. Para poder averiguar se a hipótese, de que a incidência de Hantavírus em pequenos mamíferos tende a ser maior em regiões degradadas do que em regiões preservadas, é verdadeira.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

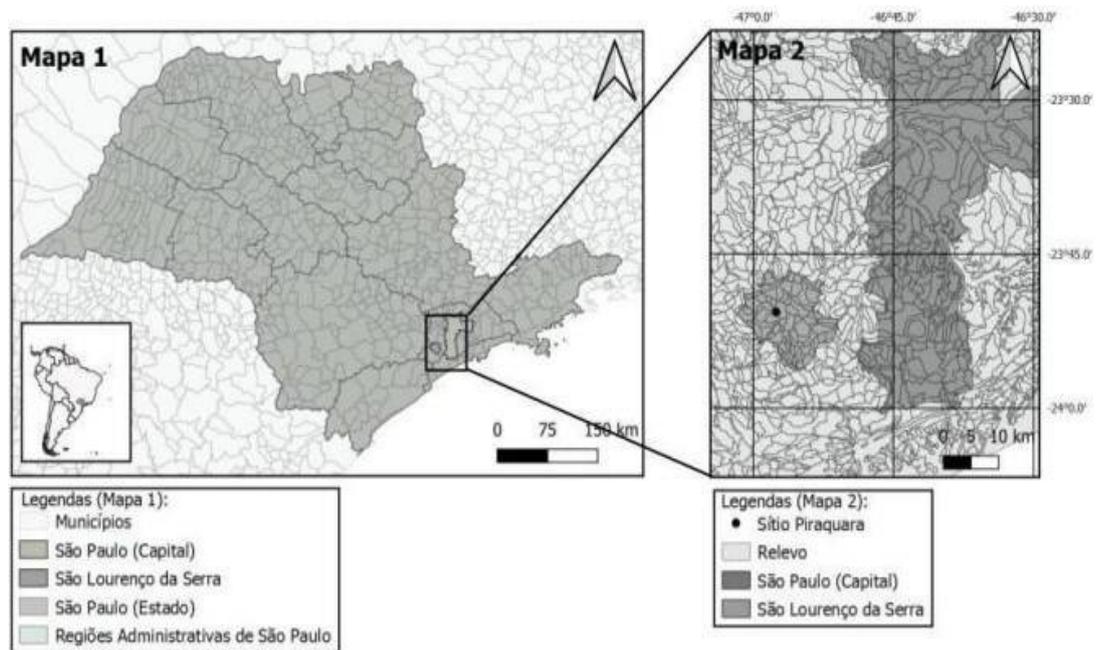
Foram realizadas duas campanhas de campo para a captura de pequenos mamíferos terrestres. Para a detecção de Hantavírus, foram coletadas e analisadas amostras de *swabs* orais e retais dos espécimes. As campanhas foram realizadas entre os dias 17 e 26 de setembro, e entre 17 e 24 de outubro de 2022. Também foram analisadas amostras de *swabs* orais e retais coletados anteriormente em quirópteros no mesmo local, entre os dias 02 e 08 de setembro de 2021.

Todos os animais amostrados durante as campanhas tiveram as coletas de material biológico realizadas de acordo com a licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBio/ICMBio: 28198-16), e também de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB: 1003051022). Os pequenos mamíferos terrestres foram capturados e manuseados de acordo com os procedimentos de segurança recomendados.

3.1 Local de estudo

A área de estudo, em uma região periurbana de Mata Atlântica, está localizada no município de São Lourenço da Serra, o Sítio Piraquara (-23.845229209972224, -46.96978275057493), no interior do estado de São Paulo, como mostra na figura 1. Este sítio é formado por um conjunto de fragmentos florestais primários e secundários, em estágios de regeneração, e áreas antropizadas. Conta com a presença de animais domésticos e mantém uma alta variedade de animais silvestres (PREVIR, 2021).

Figura 1 - Área de estudo, localizada em São Lourenço da Serra.

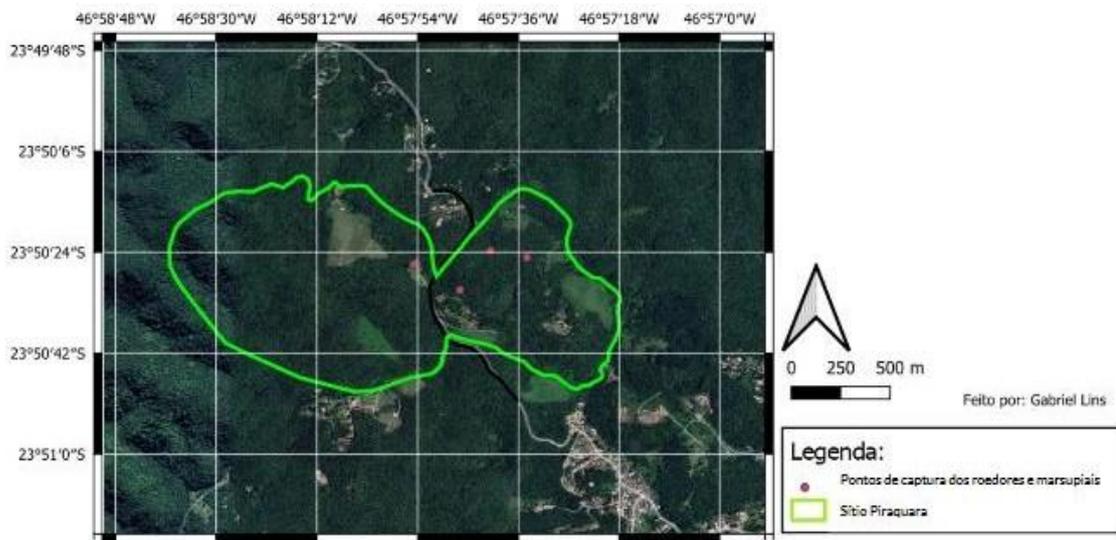


Fonte: PREVIR, 2021.

3.2 Métodos de captura e coleta de amostras

Para a captura dos marsupiais e roedores, foram utilizadas armadilhas de contenção dos tipos Sherman e Tomahawk, contendo iscas feitas com banana, paçoca, sardinha e fubá. Foram colocadas 99 armadilhas em quatro pontos diferentes, conforme mostra a figura 2, dispostas de forma intercalada e distanciadas em cerca de 5 metros, no solo e acima do solo, em galhos ou cipós. Sendo no mínimo duas e no máximo seis noites de captura para cada trilha durante as campanhas. A vistoria das armadilhas foi realizada às 8h em três trilhas, durante cinco dias na primeira campanha de campo, e em três trilhas, durante seis dias na segunda campanha de campo (PARDINI, 2004; UMETSU; PARDINI, 2007). As imagens das armadilhas de contenção dispostas nas trilhas, e de dois espécimes capturados nessas armadilhas, seguem em apêndice, imagens de 1 a 9.

Figura 2 - Pontos de captura dos pequenos mamíferos terrestres.



Fonte: LINS, 2022.

Para a captura dos morcegos, foram utilizadas redes de neblina, dispostas em trilhas, podendo estar junto a árvores em frutificação e também próximo a corpos d'água. Foram colocadas 20 redes de neblina (14x9 m²) em diferentes pontos, sendo uma noite de captura para cada ponto. As redes foram abertas às 18h e fechadas às 00h, e a captura dos espécimes e coleta das amostras foi realizada durante a vistoria das redes, que aconteceram a cada 20min no período em que as redes ficaram abertas (ESBÉRARD, 2003; ESBÉRARD; BERGALLO, 2008).

Os animais capturados foram avaliados, identificados pela morfologia externa em campo e as amostras de *swabs* orais e retais foram coletadas para análise viral. Não havendo a possibilidade de identificação do espécime em campo, em caso de primeiro registro da espécie para o local, ou morte acidental, também foram coletados os órgãos. As peles e os esqueletos foram preparados para depósito na coleção científica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), e os órgãos também serão utilizados para futuras análises virais. Os demais espécimes capturados foram marcados, através de anilhas metálicas, e soltos.

As amostras de *swab* oral e retal foram depositadas em criotubo contendo *VTM* (*Viral Transport Medium*), enquanto as amostras de órgãos foram depositadas em criotubo seco. Ambas as amostras, de *swabs* e órgãos, foram mantidas em *Dry Shipper* até a chegada ao Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM) do

Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo (ICB-II, USP), onde foram armazenadas no freezer -80°C.

3.3 Processamento das amostras e análise de dados

Para os procedimentos de análises foram utilizados *primers* desenhados por Araujo (2010). Esses *primers* foram manipulados a partir do alinhamento das sequências do segmento genômico S dos Hantavírus brasileiros, por esse segmento apresentar uma maior similaridade entre todos os Hantavírus do Brasil, comparado aos outros dois segmentos. A sequência dos *primers* utilizados foi: *Forward*: JAN F - 5'- CCC TGT TGG ATC AAC TGG TTT TG- 3' e *Reverse*: JAN R - 5'- GAT GAC GTT AAC AAG AGC ACA TT A CA - 3'. Os *primers* foram projetados para gerar um *amplicon* de 141 pb na detecção viral. O controle positivo usado para a sistematização dos testes foi processado através de amostras do *Orthohantavírus* RIOMV (HTN007) por cultivo celular, as amostras foram obtidas a partir de material cedido pelo Laboratório de Arbovírus da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. O controle negativo utilizado nos testes foi amostras de água *Nuclease-free* ou do mix restante confeccionado para as análises, sem a adição das amostras ou do controle positivo (ARAUJO, 2010).

3.3.1 Pequenos mamíferos terrestres

Os materiais genéticos das amostras de pequenos mamíferos terrestres foram extraídos a partir do extrator automático *DNA RNA extractor MAGMAX™ EXPRESS-96 (Applied Biosystems)*. Para esse procedimento foi utilizado o *MagMax TM-96 RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific)*, de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizadas quatro placas, na placa de número 1 foi adicionado um mix de: 15,0µl de *Binding Beads* e 10,0µl de *Proteinase K (PK)*, logo em seguida foi adicionado: 300µl de cada amostra com 400µl de *Binding*, já homogeneizados anteriormente, totalizando um mix de 7250µl por poço na placa. Nas placas 2, 3 e 4, foram adicionados: 500µl de *Wash*, 1000µl de Etanol_[80%] e 110µl de *Elution Buffer*, por poço, respectivamente, em cada placa. Após adicionar as amostras e os reagentes nas placas, estas foram inseridas no extrator.

Após a extração, os materiais genéticos das amostras e dos controles positivo e negativo foram amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR), pelo método *SYBR-Green* no termociclador *7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. Para esse procedimento foi utilizado o *QuantiFast (QF) Probe PCR kit (QIAGEN)*, de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados: 2,25µl de água *Nuclease-free*, 12,5µl de 2x *QF Syber mix*, 1,0µl do *Primer JAN F*_[10pM], 1,0µl do *Primer JAN R*_[10pM], 0,25µl de *QF RT mix* e 8,0µl de cada amostra extraída e dos controles, totalizando em 25,0µl por poço na placa. Após adicionar os reagentes na placa do extraído, esta foi colocada no termociclador onde se aplicou o ciclo de: 50°C por 10 min, 95°C por 5 min, 95°C por 10s, 60°C por 30s, sendo esses dois últimos ciclos repetidos por 35 vezes, 95°C por 15s, 60°C por 30s e 95°C por 15s.

Após esse procedimento, o qPCR das amostras e dos controles positivo e negativo foram dissociados por eletroforese em gel de Agarose_[2%], para a confirmação do resultado obtido pelo método *SYBR-Green*. Para esse procedimento foram utilizados: 300 ml de TAE_[0,5%] e 6,0g de Agarose_[2%], após a diluição da Agarose na solução tampão TAE, foi adicionado: 6,0µl de Brometo de etídeo_[1%]. Posterior a polimerização do gel aplicou-se: 10,0µl da qPCR de cada amostra e dos controles homogeneizados com 3,0µl de *Loading* em cada poço. Foi aplicado também, nos poços próximos aos das amostras: 4,0µl de *Ladder* com intervalos de bandas de 100 pares de bases (pb). O tamanho esperado de fragmentos para Hantavírus foi de aproximadamente 141 pb. A eletroforese iniciou com 90v, após a penetração das amostras e dos controles no gel, ocorreu entre 100v e 110v. Os resultados foram observados pela visualização do gel no transiluminador, considerando suspeitas as amostras que atingiram aproximadamente o tamanho esperado de fragmentos, comparando com os controles e com a ladder.

3.3.2 Morcegos

Os materiais genéticos das amostras de quirópteros, coletadas anteriormente em 2021, também foram extraídos a partir do extrator automático *DNA RNA extractor MAGMAX™ EXPRESS-96 (Applied Biosystems)*. Para esse procedimento foi utilizado o *MagMax TM-96 RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific)*, de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizadas quatro placas, na placa de número 1 foi adicionado um mix de: 20,0µl de *Binding Beads* e 50,0µl de *Lysis*_[2x], logo em

seguida foi adicionado: 300µl de cada amostra com 400µl de *Binding*, já homogeneizados anteriormente, totalizando um mix de 770µl por poço na placa. Na placa 2, 3 e 4, foram adicionados: 500µl de *Wash*, 1000µl de Etanol_[80%] e 140µl de *Elution Buffer*, por poço, respectivamente, em cada placa. Após adicionar as amostras e os reagentes nas placas, estas foram inseridas na máquina extratora.

Após a extração, foi realizada a reação de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), para obtenção do DNA complementar (cDNA) com o termociclador *9800 Fast PCR System (Applied Biosystems)*. Para esse procedimento foi utilizado o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific)*, de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados: 2,0µl de *RT Buffer*_[10x], 0,8µl de *dNTP MIX*_[100mM], 2,0µl de *RT Random Primers*_[10x], 1,0µl de *MultiScribe Reverse Transcriptase*_[50u/µl], 1,0µl de *RNaseOUT*_[100mM], 3,2µl de água *Nuclease-free* e 10,0µl de cada amostra extraída, totalizando um mix de 20,0µl por poço na placa de cDNA. Após adicionar os reagentes e o extraído das amostras, a placa foi colocada no termociclador, no qual foi aplicado o ciclo de: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 6 min e 4°C ao infinito.

Posterior a obtenção dos cDNAs, esses materiais genéticos foram amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase convencional (PCR) com o termociclador *9800 Fast PCR System (Applied Biosystems)*. Para esse procedimento foi utilizado o kit *Platinum Taq DNA Polymerase, DNA-free (Thermo Fisher Scientific)*, de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados: 2,5µl de *PCR Buffer*_[10x], 0,5µl de *dNTP MIX*_[100mM], 0,75µl de *MgCl₂*_[50mM], 0,5µl do *Primer JAN F+*_[10pM], 0,5µl do *Primer JAN R-*_[10pM], 0,15µl de *Platinum Taq DNA Polymerase*_[5u/µl], 15,1µl de água *Nuclease-free* e 5,0µl do cDNA de cada amostra e também dos controles positivo e negativo, totalizando um mix de 25,0µl por poço na placa de PCR. Após adicionar os reagentes, o cDNA das amostras e os controles, a placa foi colocada no termociclador, no qual foi aplicado o ciclo de: 94°C por 5 min, 94°C por 15s, 55°C por 30s, 72°C por 45s, sendo esses três últimos ciclos repetidos por 40 vezes, 72°C por 5min e 4°C ao infinito.

Após esse procedimento, o PCR das amostras e dos controles positivo e negativo foram dissociados por eletroforese em gel de Agarose_[2%]. Para esse procedimento foram utilizados: 300 ml de TAE_[0,5%] e 6,0g de Agarose_[2%], após a diluição da Agarose na solução tampão TAE, foi adicionado: 6,0µl de Brometo de etídeo_[1%]. Posterior a polimerização do gel aplicou-se: 10,0µl da PCR de cada amostra e dos controles homogeneizados com 3,0µl de *Loading* em cada poço. Foi aplicado

também, nos poços próximos aos das amostras: 4,0µl de *Ladder* com intervalos de bandas de 100 pares de bases (pb). O tamanho esperado de fragmentos para Hantavírus foi de aproximadamente 141 pb. A eletroforese iniciou com 90v, após a penetração das amostras e dos controles no gel, ocorreu entre 100v e 110v. Os resultados foram observados pela visualização do gel no transiluminador, considerando suspeitas as amostras que atingiram aproximadamente o tamanho esperado de fragmentos, comparando com os controles e com a ladder.

As amostras suspeitas foram purificadas e sequenciadas, pelo método Sanger no sequenciador automático *ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems)*, para determinação da presença de Hantavírus. Para esse procedimento são realizadas quatro etapas, a primeira etapa é a purificação *ExoSAP*, na qual foram utilizados: 3,0µl de *ExoSAP-IT*_[5000 rxns] e 5,0µl do PCR das amostras suspeitas e dos controles positivo e negativo, totalizando um mix de 8,0µl por poço na placa. Após adicionar os reagentes, o PCR das amostras e dos controles, a placa foi colocada no termociclador, sendo aplicado o ciclo de: 37°C por 15 min, 80°C por 15 min e 4°C ao infinito. Após a reação ocorrer no termociclador foi adicionado 10,0µl de água *Nuclease-free*. A segunda etapa é a de sequenciamento, na qual foram utilizados: 1,0µl *BigDye*, 1,0µl do *Primer JAN F*_[10pM], 3,0µl de *BigDye buffer*_(5x) e 6,0µl de cada amostra e dos controles processados na purificação *ExoSAP*, totalizando um mix de 10,0µl por poço na placa F, e 1,0µl *BigDye*, 1,0µl do *Primer JAN R*_[10pM], 3,0µl de *BigDye buffer*_(5x) e 6,0µl de cada amostra e dos controles processados na purificação *ExoSAP*, totalizando um mix de 10,0µl por poço na placa R. Após adicionar os reagentes, as amostras e os controles processados na purificação *ExoSAP*, as placas foram colocadas no termociclador, no qual foi aplicado o ciclo de: 96°C por 1 min, 96°C por 15s, 50°C por 15s, 60°C por 4 min, sendo esses três últimos ciclos repetidos por 30 vezes, e 4°C ao infinito.

A terceira etapa é a de purificação *X Terminator*, na qual foram utilizados: 45,0µl de *Buffer* e 10,0µl de *BigDye X Terminator*, que foram aplicadas diretamente nas amostras e nos controles processados no sequenciamento, resultando em um mix de 65,0 por poço em cada placa. Logo em seguida todas as amostras e os controles foram submetidos ao vórtex em 2000 rpm por 30 min, na centrífuga em 1000 rpm por 2 min e após esses procedimentos foi retirado 20µl do sobrenadante dessas placas e colocado nas placas para o sequenciamento final. A quarta etapa é a do sequenciamento final, onde as amostras e os controles, após passarem pelas etapas

anteriores de purificações e sequenciamento, são submetidas à eletroforese capilar em um analisador genético. As leituras das reações foram feitas no sequenciador automático, seguindo as recomendações do fabricante. As placas de sequenciamento foram inseridas na máquina, após sua configuração, e o material genético das amostras e dos controles positivo e negativo foram sequenciados. Após o sequenciamento os resultados foram comparados com dados disponíveis no *GenBank*, para constatar se as sequências resultantes das amostras são de Hantavírus, ou não.

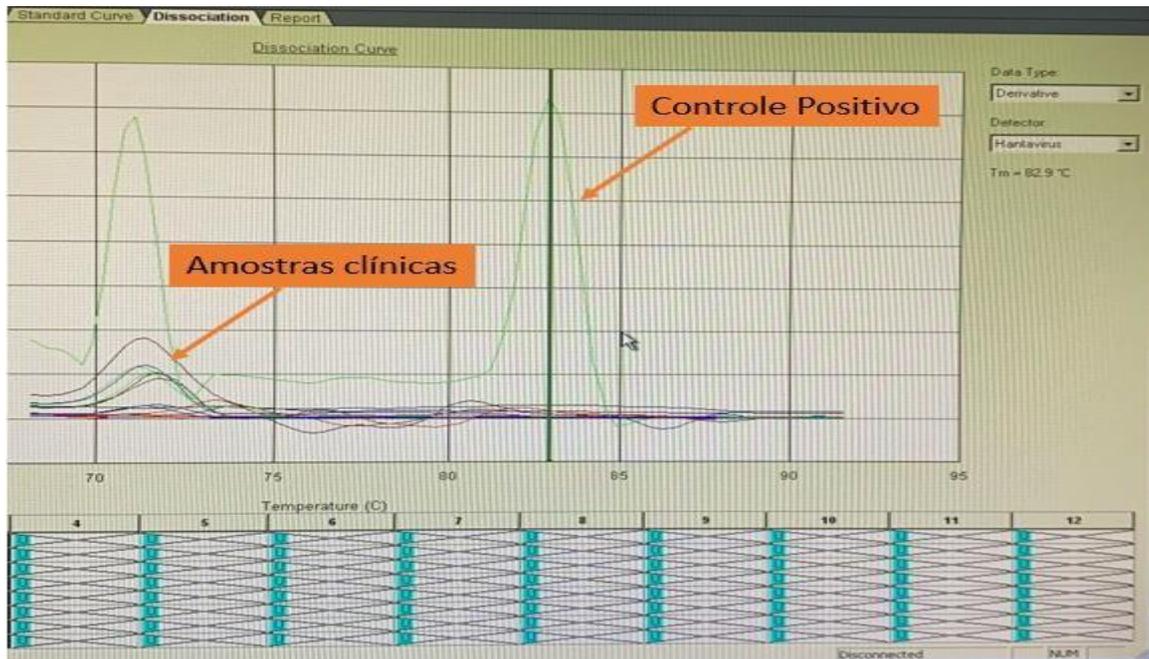
4 RESULTADOS

4.1 Pequenos mamíferos terrestres

Em campo foram capturados 13 espécimes de pequenos mamíferos terrestres, sendo 7 marsupiais e 6 roedores. Desse total, 3 marsupiais pertencentes à espécie *Didelphis aurita* foram capturados, coletadas suas amostras e posteriormente soltos. Os outros 10 indivíduos foram coletados, após a coleta de suas amostras, sendo 6 roedores e 4 marsupiais.

As espécies de marsupiais amostradas foram: *Didelphis aurita* (gambá-de-orelha-preta-do-leste) (n= 3), *Gracilinanus sp.* (cuíca-graciosa) (n= 3), *Monodelphis sp.* (cuíca-de-rabo-curto) (n= 1). As espécies de roedores amostradas foram: *Akodon sp.* (camundongo-do-mato) (n= 2), *Euryoryzomys russatus* (rato-do-arroz-vermelho) (n= 3), *Juliomys sp.* (rato-do-nariz-vermelho) (n= 1), as imagens desses espécimes seguem em apêndice, imagens de 10 a 15, respectivamente. Dessas 13 amostras de pequenos mamíferos terrestres, que foram submetidas a extração e processadas pela qPCR, pelo método *SYBR-Green*, nenhuma foi suspeita para a presença de Hantavírus, mesmo após a eletroforese no gel de Agarose^[2%], para a confirmação dos resultados gerados pelo qPCR por *SYBR-Green*. Todas as amostras: O01, O02, O03, O04, O05, O06, O07, R01, R02, R03, R04, R05 e R06, estão representadas nos métodos de análise, conforme mostra as figuras 3 e 4.

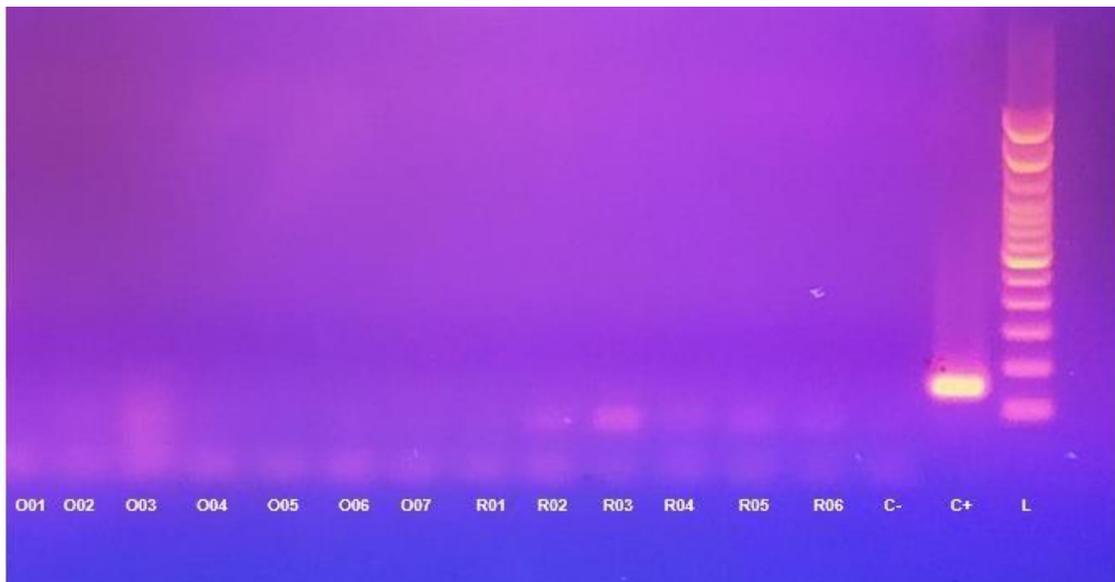
Figura 3 - Curva de dissociação, dos produtos qPCR para Hantavírus, por SYBR-Green.



Fonte: DURIGON; ASSIS, 2022.

Legenda: Amostras clínicas: OR1 a OR7: amostras de marsupiais, e R01 a R06: amostras de roedores. Controle positivo: amostras de RIOMV (HTN007) processadas por cultivo de células.

Figura 4 - Eletroforese em gel de Agarose[2%], corado com brometo de etídeo, dos produtos de qPCR para Hantavírus.



Fonte: DURIGON; ASSIS, 2022.

Legenda: OR1 a OR7: amostras de marsupiais. R01 a R06: amostras de roedores. C-: controle negativo. C+: controle positivo. L: ladder (padrão de peso molecular de 100pb).

Consequentemente, não havendo amostras suspeitas, não houve purificação e sequenciamento. Os resultados obtidos seguem na tabela 1.

Tabela 1 - Relação do número da amostra com a espécie correspondente, temperatura na curva de dissociação, tamanho de pb no gel de Agarose^[2%] e seus resultados.

n° da amostra	Hospedeiro/Espécie	qPCR Sybr-Green (temperatura de dissociação)	Resultado qPCR- gel
Controle positivo	Cultura de células - RIOMV (HTN007)	82,9 °C	141 pb
O01	<i>Monodelphis sp.</i>	71,0 °C	Negativo
O02	<i>Didelphis aurita</i>	71,0 °C	Negativo
O03	<i>Gracilinanus sp.</i>	71,0 °C	Negativo
O04	<i>Gracilinanus sp.</i>	71,0 °C	Negativo
O05	<i>Didelphis aurita</i>	71,0 °C	Negativo
O06	<i>Gracilinanus sp.</i>	71,0 °C	Negativo
O07	<i>Didelphis aurita</i>	71,0 °C	Negativo
R01	<i>Akodon sp.</i>	71,0 °C	Negativo
R02	<i>Euryoryzomys russatus</i>	71,0 °C	Negativo
R03	<i>Euryoryzomys russatus</i>	71,0 °C	Negativo
R04	<i>Juliomys sp.</i>	71,0 °C	Negativo
R05	<i>Euryoryzomys russatus</i>	71,0 °C	Negativo
R06	<i>Akodon sp.</i>	71,0 °C	Negativo

Fonte: próprio autor, 2022.

As amostras não se dissociaram durante a temperatura esperada da curva padrão para Hantavírus (ARAUJO, 2010), entre 81°C e 82,9°C, na etapa da curva de dissociação do qPCR por *SYBR-Green*, se dissociaram durante a temperatura de 71,0°C, diferente do controle positivo que se dissociou na temperatura de 82,9°C, conforme foi mostrado na figura 3 e na tabela 1. As amostras também não tiveram amplificação de fragmentos do tamanho esperado para Hantavírus, de 141 pb, após

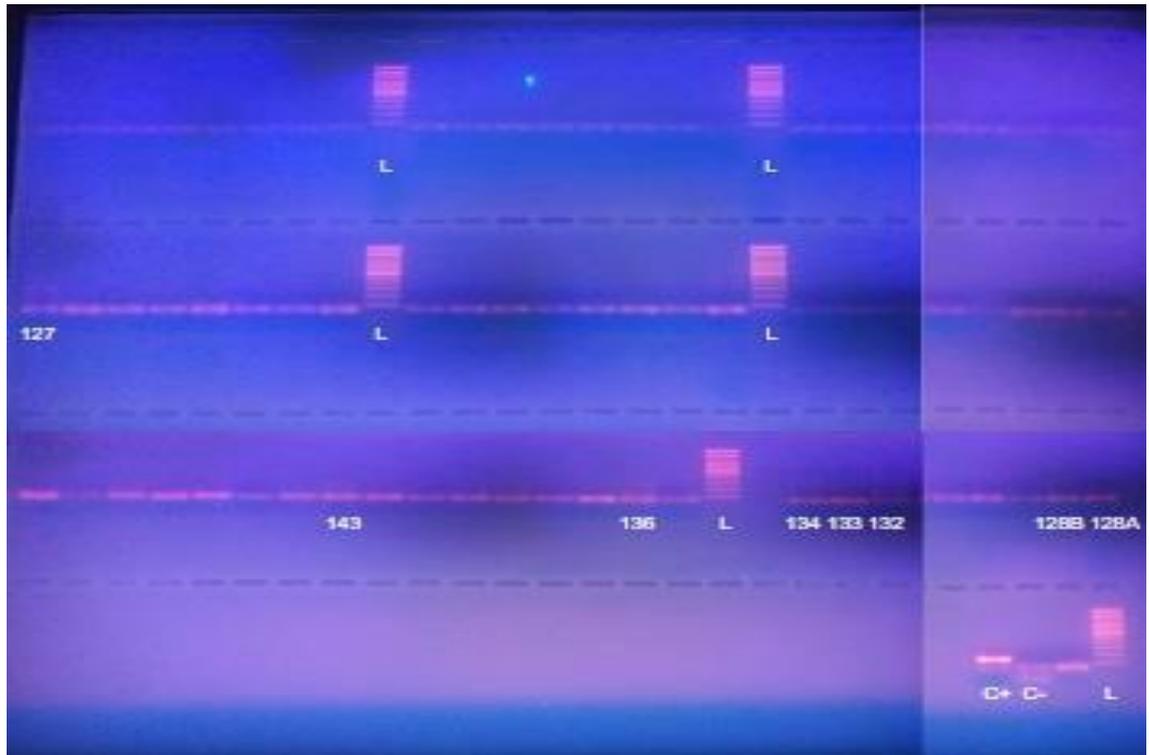
a eletroforese no gel de Agarose_[2%], diferente do controle positivo que atingiu aproximadamente os 141 pb conforme foi mostrado na figura 4 e na tabela 1.

4.2 Morcegos

Em relação às 73 amostras de quirópteros de 2021, os 71 espécimes de morcegos analisados foram: *Anoura caudifer* (morcego-beija-flor-com-cauda) (n=1), *Artibeus fimbriatus* (morcego-frugívoro-franjado) (n=5), *Artibeus lituratus* (morcego-frugívoro-grande) (n=1), *Carollia perspicillata* (morcego-da-cauda-curta-de-seba) (n=10), *Desmodus rotundus* (morcego-vampiro-comum) (n=20), *Diphylla ecaudata* (morcego-vampiro-de-perna-peluda) (n=4), *Glossophaga soricina* (morcego-beija-flor-de-língua-comprida-de-pallas) (n=2), *Mimon bennetti* (morcego-dourado-do-sul) (n=2), *Myotis nigricans* (morcego-vesper-orelha-de-rato-negro) (n=4), *Myotis riparius* (morcego-vesper-orelha-de-rato-ribeirinho) (n=5), *Myotis ruber* (morcego-vesper-orelha-de-rato-vermelho) (n=1) e *Sturnira lilium* (morcego-do-ombro-amarelo-pequeno) (n=16).

Dessas 73 amostras de morcegos, que foram submetidas à extração, obtenção do cDNA e processadas pela PCR, apenas 8 foram suspeitas para a presença de Hantavírus, após a eletroforese no gel de Agarose_[2%]. As amostras suspeitas: 127, 128A, 128B, 132, 133, 134, 136 e 143, estão representadas no método de análise, conforme mostra a figura 5.

Figura 5 - Eletroforese em gel de Agarose_[2%], corado com brometo de etídeo, dos produtos de PCR para Hantavírus.



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: 127, 128A, 128B, 132, 133, 134, 136 e 143: amostras suspeitas para *Orthohantavírus*. C-: controle negativo. C+: controle positivo. L: ladder (padrão de peso molecular de 100pb).

Posteriormente as amostras suspeitas e os controles foram purificados e sequenciados. Das 8 amostras submetidas ao sequenciamento, 3 geraram sequenciamentos inespecíficos, e o controle positivo gerou o sequenciamento esperado, como demonstrado na tabela 2 e nas figuras 6, 7, 8 e 9 a seguir. As cinco amostras restantes não geraram sequenciamentos. Para todas as 8 amostras de morcegos os resultados para Hantavírus foram negativos.

Tabela 2 - Relação do número da amostra com a espécie correspondente, tamanho de pb no gel de Agarose_[2%], seus resultados e sequenciamentos. Obs: As amostras suspeitas estão em destaque.

n° da amostra	Hospedeiro/Espécie	Resultado PCR - gel	Sequenciamento
Controle positivo	Cultura de células - RIOMV (HTN007)	141 pb	RIOMV (HTN007)
79	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Negativo
80	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo
81	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo

82	<i>Myotis riparius</i>	Negativo	Negativo
83	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo
84	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo
85	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Negativo	Negativo
86	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Negativo
87	<i>Artibeus lituratus</i>	Negativo	Negativo
88	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo
89	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo
90	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Negativo	Negativo
91	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Negativo	Negativo
92	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo
93	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Negativo	Negativo
94	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Negativo	Negativo
96	<i>Myotis nigricans</i>	Negativo	Negativo
97	<i>Myotis nigricans</i>	Negativo	Negativo

98	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo
99	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo
100	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
101	<i>Myotis nigricans</i>	Negativo	Negativo
102	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
103	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
104	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo
105	<i>Myotis nigricans</i>	Negativo	Negativo
106	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Negativo
107	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
108 A	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
108 B	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
109	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Negativo
110	<i>Mimon bennettii</i>	Negativo	Negativo
111	<i>Diphylla ecaudata</i>	Negativo	Negativo
112	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
113	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
114	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
115	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo
116	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Negativo

117	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
118	<i>Diphylla ecaudata</i>	Negativo	Negativo
119	<i>Mimon bennettii</i>	Negativo	Negativo
120	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
121	<i>Glossophaga soricina</i>	Negativo	Negativo
122	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Negativo

123	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Negativo
124	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Negativo
125	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
126	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
127	<i>Diphylla ecaudata</i>	Suspeito - 150 pb	Sem alinhamento
128 A	<i>Sturnira lilium</i>	Suspeito - 150 pb	<i>Streptomyces marincola</i> (30pb)
128 B	<i>Sturnira lilium</i>	Suspeito - 200 pb	Sem alinhamento
129	<i>Myotis riparius</i>	Negativo	Negativo
130	<i>Myotis riparius</i>	Negativo	Negativo
131	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
132	<i>Desmodus rotundus</i>	Suspeito - 200 pb	<i>Brachyptera putata</i> (99pb)
133	<i>Diphylla ecaudata</i>	Suspeito - 300 pb	Sem alinhamento
134	<i>Desmodus rotundus</i>	Suspeito - 300 pb	<i>Carollia perspicillata</i> (88pb)
135	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
136	<i>Myotis ruber</i>	Suspeito - 250 pb	Sem alinhamento
137	<i>Glossophaga soricina</i>	Negativo	Negativo
138	<i>Myotis riparius</i>	Negativo	Negativo
139	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
140	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo
141	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo
142	<i>Sturnira lilium</i>	Negativo	Negativo
143	<i>Sturnira lilium</i>	Suspeito - 200 pb	Sem alinhamento
144	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Negativo
145	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
146	<i>Anoura caudifer</i>	Negativo	Negativo
147	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativo	Negativo
148	<i>Myotis riparius</i>	Negativo	Negativo
149	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo
150	<i>Desmodus rotundus</i>	Negativo	Negativo

Fonte: próprio autor, 2022.

Figura 8 - Sequenciamento da amostra 132.

Download GenBank Graphics Next Previous Descriptions

Brachyptera putata genome assembly, chromosome: 8
Sequence ID: [OU015469.1](#) Length: 27839412 Number of Matches: 1

Range 1: 5170996 to 5171130 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
61.7 bits(67)	3e-04	99/144(69%)	24/144(16%)	Plus/Minus

```

Query 469 AAACCAAAAACCCCTTTTATATCAAAAAA --- BBBBBBBBBBBBBBAAATCITTGGGG 524
          |||
Sbjct 5171130 AAACCAAAAACCCCTTTTAAAAAATAAAGGGGGGGGGGTTT----- 5171075

Query 525 GAAAccccccccccAGAAI llllLauggggg ----- llllllllllccccc llaa 573
          |||
Sbjct 5171074 -----TCCCCCCCCCCTTAAATTTAAGGGGGGGGTTTTTTTTTTTTTCCCCCAAAAAA 5171020

Query 574 aaaaattttttggggcaaaaaaaaaa 597
          |||
Sbjct 5171019 AAATTTTTTTTGGCCAAAAAAA 5170996
  
```

Fonte: Genbank.

Legenda: 69% semelhante em um trecho de 99 pb ao cromossomo 8 do genoma do inseto *Brachyptera putata*.

Figura 9 - Sequenciamento da amostra 134.

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 1 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	Per Ident	Acc Len	Accession
Carollia perspicillata clona 598J23 complete sequencia	Carollia perspicillata	55.4	55.4	24%	73.95%	130/53	AC148202.3

Fonte: Genbank.

Legenda: 73,95 % semelhante em um trecho de 88 pb ao genoma do morcego *Carollia perspicillata*.

As seqüências foram comparadas com as semelhantes e existentes no *GenBank*, usando o *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. O controle positivo gerou o sequenciamento esperado, se associou ao gene da proteína do nucleocapsídeo da cepa RIOMV (HTN007) com 98% de semelhança e também ao segmento S que codifica a proteína do nucleocapsídeo do vírus RIOMV (HTN007) com 97% de semelhança, conforme mostra a figura 6 e a tabela 2.

As amostras sequenciadas que geraram resultados inespecíficos obtiveram essas seqüências resultantes possivelmente porque as seqüências de DNA presentes nos fragmentos sequenciados das amostras se associaram às seqüências de DNA semelhantes presentes nos fragmentos das seqüências resultantes. A amostra 128 A se associou ao cromossomo SCSIO 64649 do genoma da bactéria *Streptomyces marincola*, em um trecho sequenciado de 30 pb com 94% de semelhança, como

mostrado na figura 7 e na tabela 2, provavelmente por conta da amostra ter a presença dessa bactéria ou pelo fato das sequências de DNA desse trecho serem semelhantes. A amostra 132 se associou ao cromossomo 8 do genoma do inseto *Brachyptera putata*, em um trecho sequenciado de 99 pb com 69% de semelhança, como mostrado na figura 8 e na tabela 2, provavelmente pelas sequências de DNA desse trecho serem semelhantes. A amostra 134 se associou ao genoma do morcego *Carollia perspicillata*, em um trecho sequenciado de 88 pb com 73,95 %, como mostrado na figura 9 e na tabela 2, provavelmente pelas sequências de DNA desse trecho serem semelhantes.

5 DISCUSSÃO

A não detecção de Hantavírus nos pequenos mamíferos amostrados no Sítio Piraquara não exclui a possibilidade de presença deste vírus nesses animais na área amostrada e também na região em que essa área se encontra, visto que este vírus já foi encontrado em regiões próximas, como em Juquitiba (SILVA *et al.*, 1997). Deve-se considerar que o n amostral, principalmente dos pequenos mamíferos terrestres, analisado durante o projeto foi baixo, influenciando nos resultados negativos. A incidência de Hantavírus em morcegos e marsupiais na natureza é baixa, já que são considerados hospedeiros, e não reservatórios, como os roedores. Hantavírus são vírus de RNA muito sensíveis e podem ser detectados mais facilmente nos órgãos de animais infectados coletados (ARAUJO, 2010; CALISHER *et al.*, 2006; GUTERRES *et al.*, 2018). É necessário que pesquisas como essas continuem sendo realizadas em larga escala para que se tenha um controle viral, juntamente com uma ampliação sob a identificação de áreas de risco e maiores identificações e controles sob as espécies reservatórios e espécies hospedeiros, que podem se tornar potenciais reservatórios.

O Hantavírus foi reconhecido como uma importante doença zoonótica, é um grande problema para a saúde pública. No Brasil as hantavirose são infecções emergentes, sendo transmitidas majoritariamente por roedores endêmicos do Cerrado e da Mata Atlântica. As infecções por Hantavírus são doenças infecciosas raras, de baixa incidência, mas com uma alta taxa de mortalidade. Ainda não há opções de tratamento relacionadas diretamente à doença e também ainda não há vacinação para imunização da população. A SPCVH é uma das doenças tropicais mais letais e menos estudadas. A maioria das doenças infecciosas emergentes humanas se origina de animais não humanos e os distúrbios ambientais relacionados ao homem estão diretamente relacionados ao surgimento dessas zoonoses (ELLWANGER *et al.*, 2022; KOEHLER *et al.*, 2022; MUYLEAERT *et al.*, 2019; PRIST; D'ANDREA; METZGER, 2017). Alterações ecológicas, principalmente as de origem antropogênica, como já dito anteriormente, desempenham um papel importante na emergência de Hantavírus como um patógeno humano (OWEN *et al.*, 2010).

Além da fragmentação de habitat e da influência das condições climáticas na paisagem, a monocultura de cana-de-açúcar tem grandes influências na incidência de hantavirose como infecção humana. Áreas antropogênicas usadas para este fim agrícola influenciam na dispersão de espécies de roedores generalistas reservatórios

e/ou hospedeiros de Hantavírus, aumentando a abundância dessas espécies e afetando a dinâmica populacional de roedores. Essas regiões de alto risco dispõem de uma alta disponibilidade de recursos alimentares e um microbioma favorável para esses animais e também para a prevalência viral no ambiente (DONALÍSIO; PETERSON, 2011; MUYLAERT *et al.*, 2019; PRIST *et al.*, 2017; PRIST; D'ANDREA; METZGER, 2017). As plantações de cana-de-açúcar suportam uma maior abundância de roedores do que outros ecossistemas naturais ou agrícolas. O Brasil é o maior produtor e exportador dessa mercadoria no mundo, e a maior parte da produção de cana-de-açúcar é vinda do estado de São Paulo. O cultivo tende a aumentar cada vez mais, podendo trazer implicações para o risco da Síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavírus no estado e em estados vizinhos do Sul e Centro-Oeste brasileiro. A maioria dos indivíduos afetados pela SPCVH no Brasil atuam em atividades agrícolas ou florestais (PRIST *et al.*, 2016; PRIST *et al.*, 2017).

Avaliar as contribuições dos fatores de risco para a incidência de Hantavírus e a consequente contaminação de SPCVH em humanos pode permitir previsões de futuros surtos e é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de saúde pública (PRIST *et al.*, 2017). Proteger o meio ambiente também é uma medida de saúde pública, ações de conservação que protegem o meio ambiente, limitam a propagação de doenças infecciosas. A conservação da biodiversidade reduz o risco de surgimento de novas doenças zoonóticas. A biodiversidade pode “diluir” o risco de eventos de transbordamento zoonótico (ELLWANGER *et al.*, 2022; POWER; MITCHELL, 2004). Mas países com alta biodiversidade, na maioria das vezes, são aqueles onde a carga de doenças de origem zoonótica é maior, como por exemplo no Brasil. Fatores relacionados com a demografia e questões sociais, como condições sanitárias inadequadas e sistemas de saúde pública precários, podem anular o efeito de diluição associado à alta biodiversidade (ELLWANGER *et al.*, 2021; ELLWANGER *et al.*, 2022; IPBES 2020).

A preservação e restauração de biomas como a Mata Atlântica pode diminuir a abundância de espécies reservatórios de Hantavírus e também de outras zoonoses. Essas ações têm um efeito importante na regulação de doenças, podendo tornar as paisagens mais saudáveis (PRIST *et al.*, 2021).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não foi possível averiguar se a hipótese, de que a incidência de Hantavírus em pequenos mamíferos tende a ser maior em regiões degradadas do que em regiões preservadas, é verdadeira. É necessário que haja um monitoramento contínuo, em pequenos mamíferos e também em outros animais silvestres, para que se tenha um controle viral eficaz e também para antecipar o surgimento de novos vírus de origem zoonótica.

REFERÊNCIAS

- ABREU, Edson F.; *et al.* Lista de mamíferos do Brasil (2021-2). **Zenodo**, v. 10, 2021.
- AB'SÁBER, Aziz N. **Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas**. Ateliê editorial, 2003.
- ALLOCATI, Nerino.; *et al.* Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. **Cell death discovery**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2016.
- ARAI, Satoru; YANAGIHARA, Richard. Genetic diversity and geographic distribution of bat-borne hantaviruses. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 1-28, 2020.
- ARAUJO, Jansen. **Deteção molecular de hantavírus pela técnica de real-time PCR em amostras de roedores silvestres coletadas na região do Vale do Ribeira no Estado de São Paulo**. 2020. Tese de Doutorado em Biotecnologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- ARAUJO, Jansen.; *et al.* Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. **BMC research notes**, v. 5, p. 1-5, 2012.
- ARAUJO, Jansen.; *et al.* Co-circulation in a single biome of the Jucituba and Araraquara hantavirus detected in human sera in a sub-tropical region of Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 87, n. 5, p. 725-732, 2015.
- BAUERFEIND, Rolf. *et al.* **Zoonoses: Infectious diseases transmissible from animals to humans**. John Wiley & Sons, 2016.
- BLAST – NCBI. Genbank. 2022. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.
- BOVENDORP, Ricardo S.; *et al.* Atlantic small-mammal: a dataset of communities of rodents and marsupials of the Atlantic forests of South America. **Ecology**, v. 98, n.8, p. 2226-2226, 2017.
- BRANDÃO, Marcus V.; HINGST-ZAHER, Erika. Atlas craniano: Mamíferos da Mata Atlântica e lista de espécies. In: **Atlas Craniano: mamíferos da mata Atlântica e lista de espécies**. Tíjd Edições. São Paulo, 2021.
- BROOK, Cara E.; DOBSON, Andrew P. Bats as 'special' reservoirs for emerging zoonotic pathogens. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 3, p. 172-180, 2015.
- CALISHER, Charles H.; *et al.* Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 3, p. 531-545, 2006.
- CORRÊA, Margaret M.O.; *et al.* Quirópteros hospedeiros de zoonoses no Brasil. **Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia**, v. 67, p. 23-38, 2013.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

COUTINHO, Leopoldo M. **Biomass brasileiros**. Oficina de Textos. São Paulo, 2016.

CRISÓSTOMO, Charle F. **Pequenos mamíferos em florestas do Acre e suas taxas de infecção por agentes zoonóticos associados**. 2018. Tese de Doutorado em Biodiversidade e Saúde – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

DELGADO, Michel C. **Comunidade de pequenos mamíferos no Parque Estadual do Ibitipoca**. 2017. Tese de Mestrado em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais. Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2017.

DONALISIO, Maria R.; PETERSON, A. Townsend. Environmental factors affecting transmission risk for hantaviruses in forested portions of southern Brazil. **Acta tropica**, v. 119, n. 2-3, p. 125-130, 2011.

DURIGON, Danielle B.; ASSIS, Isabela. **Curva de dissociação, dos produtos qPCR para Hantavírus, por SYBR-Green**. 2022. 1 gráfico. Coleção particular.

DURIGON, Danielle B.; ASSIS, Isabela. **Eletroforese em gel de Agarose[2%], corado com brometo de etídeo, dos produtos de qPCR para Hantavírus**. 2022b. 1 foto. Coleção particular.

ELLWANGER, Joel H.; *et al.* Control and prevention of infectious diseases from a One Health perspective. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, 2021.

ELLWANGER, Joel H.; *et al.* Synthesizing the connections between environmental disturbances and zoonotic spillover. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 3, 2022.

ESBÉRARD, Carlos EL. Diversidade de morcegos em área de Mata Atlântica regenerada no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zociências**, v. 5, n. 2, p. 177-188, 2003.

ESBÉRARD, Carlos E.L.; BERGALLO, Helena G. Influência do esforço amostral na riqueza de espécies de morcegos no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 1, p. 67-73, 2008.

GALETTI, Mauro.; *et al.* Mudanças no Código Florestal e seu impacto na ecologia e diversidade dos mamíferos no Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 47-52, 2010.

GONÇALVES, Fernando.; *et al.* ATLANTIC MAMMAL TRAITS: a data set of morphological traits of mammals in the Atlantic Forest of South America. **Ecology**, v.99, n. 2, p. 498-524, 2018.

GUIMARÃES Roger R.; BOLZAN Angelica A.S.; COSTA Leonora P. Levantamento de pequenos mamíferos não-voadores de Autazes, Amazônia, Brasil, incluindo

novos táxons e ampliações de distribuição. **Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia**, v. 82, p. 68-88, 2018.

GUTERRES, Alexandro; *et al.* Co-circulation of Araraquara and Juquitiba hantavirus in Brazilian cerrado. **Microbial ecology**, v. 75, p. 783-789, 2018.

IPBES - **Workshop on Biodiversity and Pandemics**. 2020.

ICMBIO/MMA. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção: Volume II - Mamíferos**. 1 ed. Brasília, 2018.

JUNIOR Vitor L.P.; OLIVEIRA Stefan V.; SANTOS Vitorino M. Hantavirose no Brasil: aspectos clínicos e epidemiológicos de uma doença emergente grave. **Atualidades em medicina tropical no Brasil: microbiologia**, cap. 10, p. 154-174. Editora Stricto Sensu. Acre, 2020.

KOEHLER, Felix C.; *et al.* The kidney in hantavirus infection—epidemiology, virology, pathophysiology, clinical presentation, diagnosis and management. **Clinical Kidney Journal**, v. 15, n. 7, p. 1231-1252, 2022.

KRUGER, Detlev H.; *et al.* Hantaviruses—globally emerging pathogens. **Journal of clinical virology**, v. 64, p. 128-136, 2015.

KRUSE, Hilde; KIRKEMO, Anne-Mette; HANDELAND, Kjell. Wildlife as source of zoonotic infections. **Emerg Infect Diseases**. v. 10, n. 12, p. 2067–2072, 2004.

LANGLOIS, Jean P.; *et al.* Landscape structure influences continental distribution of hantavirus in deer mice. **Landscape Ecology**, v. 16, p. 255-266, 2001.

LINS, Gabriel. **Pontos de captura dos pequenos mamíferos terrestres**. 2022. 1 Mapa aéreo. Coleção particular.

LOPES, Maria Aparecida; MENDES-OLIVEIRA, Ana Cristina. A Amazônia brasileira e os pequenos mamíferos não-voadores. **Pequenos mamíferos não-voadores da Amazônia brasileira**. Série Livros, v. 2, cap. 1, p. 15-20. Sociedade Brasileira de Mastozoologia. Rio de Janeiro, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância, prevenção e controle das hantavirose**s. Secretaria de vigilância em Saúde. Brasília, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças tropicais negligenciadas**. Secretaria de vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico, n. especial. Brasília, 2021.

MUYLAERT, Renata L.; *et al.* Spatiotemporal dynamics of hantavirus cardiopulmonary syndrome transmission risk in Brazil. **Journal Viruses**, v. 11, n. 11, p. 1008, 2019.

OWEN, Robert D.; *et al.* Spatiotemporal variation in *Akodon montensis* (Cricetidae: Sigmodontinae) and hantaviral seroprevalence in a subtropical forest ecosystem. **Journal of Mammalogy**, v. 91, n. 2, p. 467-481, 2010.

PAGLIA, Adriano P.; *et al.* Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. **Occasional papers in conservation biology**, 2 ed, v. 6, n. 6, 2012.

PAPI, Bernardo; *et al.* Pequenos Mamíferos Não-Voadores. **Fauna de vertebrados do entorno da Estrada de Ferro Carajás**. cap. 6, p. 173-187. Editora Rupestre. Belo Horizonte, 2020.

PARDINI, Renata; UMETSU, Fabiana. Pequenos mamíferos não-voadores da Reserva Florestal do Morro Grande: distribuição das espécies e da diversidade em uma área de Mata Atlântica. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 2, 2006.

PASSAMANI, Marcelo. **O Efeito da fragmentação da Mata Atlântica Serrana sobre a comunidade de pequenos mamíferos de Santa Teresa, Espírito Santo**. 2003. Tese de Doutorado em Ecologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

PEREIRA, Augusto S. Análise das tendências de aplicação do conceito de periurbano. **Terr@ Plural**, v. 7, n. 2, p. 287-304, 2013.

PINTO, Israel S.; *et al.* Pequenos mamíferos não voadores em fragmentos de Mata Atlântica e áreas agrícolas em Viana, Espírito Santo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, p. 355-360, 2009.

PREVIR. **Informe Rede PREVIR - MCTI**. 2021.

PRIST, Paula R.; *et al.* Landscape, environmental and social predictors of Hantavirus risk in São Paulo, Brazil. **PLoS one**, v. 11, n. 10, p. e0163459, 2016.

PRIST, Paula R.; D' ANDREA, Paulo S.; METZGER, Jean P. Landscape, climate and hantavirus cardiopulmonary syndrome outbreaks. **Ecohealth**, v. 14, p. 614-629, 2017.

PRIST, Paula R.; *et al.* Climate change and sugarcane expansion increase Hantavirus infection risk. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005705, 2017.

PRIST, Paula R.; *et al.* Moving to healthier landscapes: Forest restoration decreases the abundance of Hantavirus reservoir rodents in tropical forests. **Science of the Total Environment**, v. 752, p. 141967, 2021.

POWER, Alison G.; MITCHELL, Charles E. Pathogen spillover in disease epidemics. **The American Naturalist**, v. 164, n. 5, p. S79-S89, 2004.

REIS, Nelio R. **Morcegos do brasil**. Univesidade Estadual de Londrina, 2007.

SABINO-SANTOS JR, G. **Ecologia de hantavírus e de ectoparasitos em pequenos mamíferos selvagens**. Tese de Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SCHMALJOHN, Connie; HJELLE, Brian. Hantaviruses: a global disease problem. **Emerging infectious diseases**, v. 3, n. 2, p. 95, 1997.

SILVA, Marcos V.; *et al.* Hantavirus pulmonary syndrome: report of the first three cases in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 231-234, 1997.

SOS MATA ATLÂNTICA. **Relatório anual**. 2021.

SUZUKI, Akemi; *et al.* Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 2127, 2004.

UMETSU, Fabiana; PARDINI, Renata. Small mammals in a mosaic of forest remnants and anthropogenic habitats—evaluating matrix quality in an Atlantic forest landscape. **Landscape Ecology**, v. 22, p. 517-530, 2007.

Virus taxonomy: 2021 Release. ICTV taxonomy, 2021. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>.

WOOLHOUSE, Mark; *et al.* Human viruses: discovery and emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1604, p. 2864-2871, 2012.

APÊNDICE

Imagem 1 - Disposição de armadilha Sherman.



Fonte: Ana Carolina Pallante, 2022.

Imagem 2 - Disposição de armadilha Sherman.



Fonte: Ana Carolina Pallante, 2022.

Imagem 3 - Armadilha Sherman arborícola.



Fonte: Ana Carolina Pallante, 2022.

Imagem 4 - Armadilha Sherman arborícola.



Fonte: Ana Carolina Pallante, 2022.

Imagem 5 - Armadilha Sherman terrestre.



Fonte: Ana Carolina Pallante, 2022.

Imagem 6 - Armadilha Tomahawk terrestre.



Fonte: Ana Carolina Pallante, 2022.

Imagem 7 - Armadilha Tomahawk terrestre.



Fonte: Irineu Cunha, 2022.

Imagem 8 - *Gracilinanus* sp. na armadilha Sherman.



Fonte: Irineu Cunha, 2022.

Imagem 9 - *Didelphis aurita* na armadilha Tomahawk.



Fonte: próprio autor, 2022.

Imagem 10 - *Didelphis aurita* fêmea com seus filhotes após a soltura.



Fonte: Irineu Cunha, 2022.

Imagem 11 - *Gracilinanus* sp. macho durante a captura.



Fonte: Irineu Cunha, 2022.

Imagem 12 - *Monodelphis* sp. durante a coleta de amostras.



Fonte: próprio autor, 2022.

Imagem 13 - *Akodon* sp. durante a captura.



Fonte: Irineu Cunha, 2022.

Imagem 14 - *Euryoryzomys russatus* durante a captura.



Fonte: Irineu Cunha, 2022.

Imagem 15 - *Juliomys* sp. durante a captura.



Fonte: Irineu Cunha, 2022.