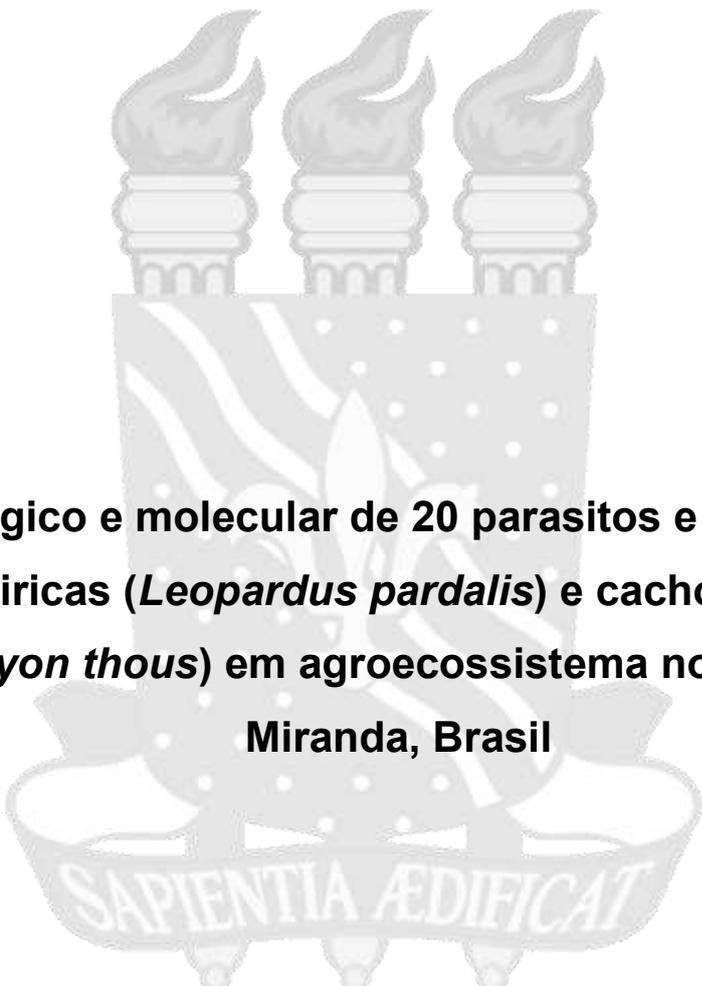




UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – CAMPUS IV LITORAL NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS APLICADAS E EDUCAÇÃO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E MONITORAMENTO AMBIENTAL



**Perfil sorológico e molecular de 20 parasitos e avaliação clínica  
de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) e cachorros-do-mato  
(*Cerdocyon thous*) em agroecossistema no Pantanal de  
Miranda, Brasil**

LAÍZA DE QUEIROZ VIANA BRAGA

Rio Tinto  
Novembro, 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – CAMPUS IV LITORAL NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS APLICADAS E EDUCAÇÃO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E MONITORAMENTO AMBIENTAL

LAÍZA DE QUEIROZ VIANA BRAGA

**Perfil sorológico e molecular de 20 parasitos e avaliação clínica de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) e cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) em agroecossistema no Pantanal de Miranda, Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Monitoramento Ambiental como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Lopes Rocha  
Coorientador: Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera

Rio Tinto  
Novembro, 2019

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

B813p Braga, Laíza de Queiroz Viana.

Perfil sorológico e molecular de 20 parasitos e avaliação clínica de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) e cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) em agroecossistema no Pantanal de Miranda, Brasil / Laíza de Queiroz Viana Braga. - João Pessoa, 2019.

52 f. : il.

Orientação: Fabiana Lopes Rocha.

Coorientação: Heitor Miraglia Herrera.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCAEE.

1. Coinfecção. 2. Carnívora. 3. Agropecuária. 4. Leptospira. 5. Saúde única. I. Rocha, Fabiana Lopes. II. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – CAMPUS IV LITORAL NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS APLICADAS E EDUCAÇÃO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E MONITORAMENTO AMBIENTAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Perfil sorológico e molecular de 20 parasitos e avaliação clínica  
de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) e cachorros-do-mato  
(*Cerdocyon thous*) em agroecossistema no Pantanal de  
Miranda, Brasil**

LAÍZA DE QUEIROZ VIANA BRAGA

ORIENTADORA: **Profa. Dra. Fabiana Lopes Rocha**

COORDENADOR: **Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera**

**Aprovada em: 25/11/2019**

BANCA EXAMINADORA:

---

Profa. Dra. Fabiana Lopes Rocha, Universidade Federal da Paraíba

---

Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva, Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Dedico esta dissertação aos meus maiores inspiradores, a quem me ensina sobre amor, igualdade, respeito e justiça; a quem me incentiva, acredita, chora e vibra comigo; aos meus exemplos de determinação e companheirismo: meus pais (**Marcília Braga e Aristides Braga Neto**) e irmãos (**Lara Braga e Leandro Viana Braga**).*

## Agradecimentos

Desde que comecei a ler dissertações e teses tenho curiosidade pelos agradecimentos. Muitos emocionantes, alguns doloridos, outros divertidos. Geralmente, cheios de amor! Chegou minha vez! E eu, ao começar essa jornada, nem imaginava que seria tão bonito escrever.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Hoje, diante de tanta desvalorização da educação, vejo como tive sorte.

Agradeço à Bia (Fabiana Rocha). Que topou essa aventura mesmo antes de me conhecer. Que se vira nos 30" e em 30. Pelas portas que me abriu. Por me desafiar, me orientar profissionalmente e como pessoa, mostrando que é possível ser firme com serenidade. Agradeço à Maluzinha, que divide a mama com tantos outros e torna a vida melhor com seus olhinhos brilhantes.

Entre as portas abertas, ganhei Heitor Herrera como coorientador. Agradeço por ser presente, ético e empolgado! Muito obrigada por aceitar nosso pedido. Aqui, aproveito para agradecer também aos membros do Laboratório Insana-Huna pela contribuição com análises e disposição com minhas tantas perguntas!

Ao Laboratório de Mamíferos da UFPB e a todos os frequentadores da "salinha da pós", que me receberam com tanto carinho e tanto ajudaram com minhas dúvidas, com conselhos e alto astral! Em especial, agradeço ao Pedro Estrela pelos desafios e humor, ao Messi pelos musicais e por ser inspirador, Fabrício pelos abraços quentinhos, Tatá pela boa energia e comentários inusitados, May pelos ouvidos cuidadosos, Jamillah por tamanha compaixão com bichos e pessoas que mais precisam, Natan por tanta gentileza, Patrício por lembrar que "a felicidade faz parte do processo", Higor pelo coração bom, Laís por tanta força, sabedoria e carinho!

Ao Professor Marcos Rogério André e Professor Marcos Bryan Heinemann, pelas colaborações e por abrirem as portas dos laboratórios (UNESP e USP)! Sem vocês este projeto não seria concretizado dessa forma! A todos que ajudaram nas bancadas e nas dúvidas, em especial, Ana Cláudia Calcchi (!!!) – e aos espetinhos de banana!

Ao LabTryp da Fiocruz e ao CCZ/SP pelas parcerias, especialmente à Fernanda e à Giselly por tamanha atenção!

Aos queridos membros da banca, Dra. Débora Castelo Branco e Dr. Jean Carlos Ramos da Silva, pelas contribuições e atenção dada à essa dissertação!

Ao Projeto de Conservação Mamíferos do Cerrado e todas suas pessoas. Em especial, agradeço ao Caio Motta pelos conhecimentos que foram além da veterinária, por tanta humanidade, cuidado e respeito com todos os seres.

De forma muito especial, agradeço a Andressa Fraga, que esteve comigo durante praticamente todo o período de mestrado, do choro ao riso, com angústias, arrumação de caixas e voos cancelados. Agradeço pela parceria em Fortaleza, no Pantanal e em João Pessoa. Agradeço imensamente a todos que nos ajudaram durante as atividades de campo. Ao Henrique Concone por permitir que entrássemos pelas portas que abriu e por dividir suas experiências na região, e a cada guia da fazenda - que ainda nos contam novidades dos bichos. Em especial, agradeço ao Pequeno Little Boy Menino Mike Junior pela sua incansável dedicação, e à Mentinha, com passagem curta e decisiva para a continuação desse projeto! À Ana, por ter nos ensinado a andar de moto.

À Lalucha Duarte, que me ajudou na interpretação dos resultados sempre que precisei.

À UFPB com seu cheiro de primavera, bichos-preguiça, feira de orgânicos e Projeto Cuidar-se e Reconecta UFPB. À Aurinha e todos os cafezinhos e ao sr. Chiquinho pelas conversas divertidas durante o almoço.

Às minhas avós Heldenísia e Beatriz pelos abraços e sorrisos a cada volta. Por serem a base forte da nossa família. Que mulheres! Ao vô Braga e ao vô Antônio, saudades! A todxs Bragas e Vianas que estiveram comigo de alguma forma.

Aos meus pais, Marcília Braga e Aristides Braga Neto, por serem incríveis na função de amar, cuidar, aconselhar e educar. Obrigada pelas revistinhas da Turma da Mônica que me fizeram gostar de ler e pelas praias desde que estava na barriga - parecem ainda me trazer a “mesma” paz sempre que preciso. Obrigada por acreditarem em mim, me mostrando que sempre vale a pena. Afinal, “o babaçu também é importante”, né?

Aos meus irmãos. Crescer com vocês foi e é uma sorte gigante! Lê por ser carinhoso à sua maneira. Amo gostar de matemática e saber que você sempre foi e é minha inspiração pra isso! Te ver em busca de ser uma pessoa melhor a cada dia me inspira muito (grata também pelos desenhos!!). Lara que me mostra que podemos ser humanas dentro das nossas profissões, que acredita, vibra, chora, ri, canta - “Vai dar certo”, lembra? Amo muito vocês!

Agradeço à natureza e a cada animal silvestre que vi durante o trabalho de campo. Vê-los sobrevivendo em paisagem tão alterada me fez ter forças pra continuar. Agradeço por me inspirarem com tanta resistência, resiliência, instinto e espontaneidade. Agradeço aos animais que já toparam dividir casa comigo: cães Apollo, Floco e Matula, carneiro Polado, coelha Tonia e porquinhos-da-índia Gordo e Ozzy. Em especial: cadelinhas Yogui, por me ensinar uma forma de amor tão especial, e Guna, por me esperar e continuar sendo doce. Maracanã Loli por entender e cantar. E gatinhos Chico e Zoo, por me fazerem rir e serem tão carinhosos! Vocês fazem parte da construção do eu que hoje sou.

À cidade de João Pessoa, com suas pessoas, sons, paisagens, forrós e seus presentes. Em especial, agradeço pela incrível rede de mulheres-maravilhosas que foi tecida aqui, que me ensinou como somos mais fortes juntas, em especial, Andressa, Clara, Cris, Jéssica e Raisia; e também aos queridos Zazu e Beбето. JP me ensinou que “caminho se conhece andando e que, vez em quando, é bom se perder”, especialmente sobre as rodas da Léri-Go e ao som do Ukulele - minhas meditações quase diárias nesse período.

Às minhas psicoterapeutas maravilhosas: Karen, Naiana e Ingrid. Aos amigxs que não deixam a distância ser problema: Denise, Cris, Edyr, Lara, Mentinha, Helda, Carol, Lídia, Iguinho e Rhay. Obrigada por serem vocês, pelo apoio e por não deixarem eu me sentir sozinha nunca!

A todxs que passaram na minha vida nesse caminho, que encerro com bagagem pessoal e profissional cheias e com muita alegria!

Tenho mesmo muita sorte na vida!

**Sou muuuuito grata!!!**



“Eles não podem prender o sonho da liberdade,  
não podem prender as ideias”  
Luís Inácio Lula da Silva



“There is always hope” - Girl with Ballon  
Banksy, Londres, 2002

**Perfil sorológico e molecular de 20 parasitos e avaliação clínica de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) e cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) em agroecossistema no Pantanal de Miranda, Brasil**

**Laíza de Queiroz Viana Braga**

***Dissertação de mestrado em Ecologia e Monitoramento Ambiental***

**RESUMO**

Investigar parasitos na fauna silvestre é importante para compreender sua manutenção na natureza, como também pelos riscos que oferecem à saúde de seus hospedeiros. Poucas pesquisas, porém, investigam amplo painel parasitário e a influência de infecções na saúde de animais selvagens. Aqui, investigamos 20 microparasitos em carnívoros que habitam a natureza por meio de provas indiretas (RIFI, ELISA, SAM, AAT e FAVN) e diretas (moleculares e parasitológicas), selecionados por terem potencial patogênico para animais silvestres, domésticos e/ou para ser humano. Paralelamente, avaliamos aspectos clínicos, escore corporal, hematócrito e 13 parâmetros bioquímicos. Para tanto, 13 jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) e 12 cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) foram capturados em mosaico de lavouras de arroz, pastagem e mata nativa no Pantanal de Miranda, Brasil. Detectamos 14 microparasitos, sendo nove protozoários, quatro bactérias e um vírus. Todos os animais capturados foram positivos para pelo dois microparasitos. A taxa de coinfeção variou de dois a nove, sendo jaguatiricas mais afetadas que cachorros-do-mato, com médias de 6,8 ( $\pm 1,5$ ) e 4,3 ( $\pm 1,4$ ), respectivamente. Relatamos *Rangelia vitalli* pela primeira vez em vertebrados no Pantanal e *Crithidia mellificae* em carnívoros. 18 animais apresentaram alterações clínicas e/ou laboratoriais, especialmente jaguatiricas. Destacamos uma alta soroprevalência de *Leptospira*, com altos títulos sorológicos (até 6.400), indicando ciclo ativo da bactéria na região, e discutimos esses resultados sob ótica da Saúde Única. Detectamos 17 sorovares, sendo a primeira descrição de Cynopteri, Butembo e Bataviae em carnívoros de vida livre no Brasil e de Autumnalis e Copenhageni em jaguatiricas. Os sorovares infectantes mais prevalentes indicam sobreposição com o ciclo bovino na área. Os resultados gerais deste trabalho podem estar relacionados à contínua exposição dos animais a agroquímicos, dado seu efeito imunossupressor. Com a liberação de diversos compostos no Brasil em 2019, é imperativa a ampliação de investigações a respeito de seus impactos na saúde silvestre.

**Palavras chave:** Coinfeção, Carnívora, agricultura, *Leptospira*, saúde única.

**Serological and molecular profile of 20 parasites and clinical evaluation of ocelots (*Leopardus pardalis*) and crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in an agroecosystem in Pantanal of Miranda, Brazil**

**Laíza de Queiroz Viana Braga**

***Master dissertation in Ecology and Environmental Monitoring***

**ABSTRACT**

Investigating parasites in wildlife fauna is important for understanding how they remain present in the wild as for the risks they pose to the health of their hosts, especially when they can also infect domestic animals and humans. However, just a few researches have worked involving a wide parasitic panel and the infection's influence on the health of wild animals. Here, we investigated 20 parasites in carnivores through indirect (IFAT, ELISA, MAT, AAT and FAVN) and direct (molecular and parasitological) tests, selected by their pathogenic potential for wild and domestic animals and/or human. In parallel, we evaluated clinical aspects, body conditions, hematocrit and 13 biochemical parameters. For this purpose, 13 ocelots (*Leopardus pardalis*) and 12 crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) were captured in a mosaic composed by rice fields, pasture and native forest in the Pantanal of Miranda, Brazil. We detected 14 parasites: seven transmitted by ticks, four trypanosomatids, *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* and rabie virus, of which eight showed a higher than 50% prevalence. The coinfection rate per individual oscilated between two and nine parasites. We describe the first report of *Rangelia vitalli* in vertebrates in the Pantanal and *Crithidia mellificae* in carnivores. 18 animals showed clinical and/or laboratory aspects alterations. Ocelots were more parasitized and more affected in clinical and laboratory aspects than crab-eating foxes. We highlight the *Leptospira*'s serum prevalence and the high titers (up to 6,400), indicating active cycle. We detected 17 serovars, being the first description of Cynopteri, Butembo and Bataviae in free-living carnivores in Brazil and Autumnalis and Copenhageni in ocelots. The most prevalent infective serovars indicate superposition with the parasite bovine cycle. We discuss *Leptospira* in the area from One Health's perspective. The work results may be related to the animals continuous exposure to agrochemicals, due to its immunosuppressive effect. With the release of several compounds in Brazil in 2019, it's imperative to expand research about their impacts on wildlife.

**Keywords:** Coinfeccion, agriculture, *Leptospira*, health.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	VII
ABSTRACT .....	VIII
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
<i>Referências</i> .....	3
CAPÍTULO 1 .....	5
INFECÇÕES MÚLTIPLAS E O ESTADO DE SAÚDE DE CARNÍVOROS SILVESTRES EM ECÓTONO DE PANTANAL E CERRADO: INVESTIGAÇÃO EM UM AGROECOSSISTEMA BRASILEIRO .....	5
<i>Resumo</i> .....	5
1. <i>Introdução</i> .....	5
2. <i>Material e Métodos</i> .....	6
3. <i>Resultados</i> .....	11
4. <i>Discussão</i> .....	16
<i>Referências</i> .....	20
CAPÍTULO 2 .....	27
ALTA PREVALÊNCIA DE <i>LEPTOSPIRA</i> SPP. EM <i>LEOPARDUS PARDALIS</i> E <i>CERDOCYON THOUS</i> (CARNIVORA) SILVESTRES EM ÁREA DE AGROECOSSISTEMA NO PANTANAL DE MIRANDA, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL .....	27
<i>Resumo</i> .....	27
1. <i>Introdução</i> .....	27
2. <i>Material e Métodos</i> .....	28
3. <i>Resultados</i> .....	32
4. <i>Discussão</i> .....	34
<i>Referências</i> .....	37
CONCLUSÕES GERAIS .....	41

## INTRODUÇÃO GERAL

Parasitos constituem um grupo com grande diversidade de espécies, subdivididas em macro e microparasitos. De acordo com a classificação utilizada por Lindenfors et al. (2007), compõem o grupo de macroparasitos os helmintos e artrópodes, e o grupo de microparasitos, vírus, bactérias, protozoários e fungos. Dada a ampla quantidade de parasitos já conhecidos, torna-se impraticável investigar todas as possibilidades de infecção em uma população. Dessa forma, na medicina veterinária de animais silvestres torna-se fundamental eleger quais grupos parasitários são de diagnóstico prioritário. Tal escolha deve considerar o foco do trabalho, como conservação da biodiversidade, saúde pública e/ou economia.

Incluir múltiplos parasitos no painel investigativo de uma população-alvo é de grande relevância não só pela grande diversidade do grupo, mas também devido às coinfeções serem mais comuns que infecções simples na fauna silvestre. Embora mais complexa, essa abordagem possibilita considerar o efeito da comunidade de parasitos sobre um hospedeiro, e não apenas a simples relação parasito-hospedeiro (Serrano e Millán 2014). Nesse sentido, vale ressaltar também que tais interações podem ser sinérgicas ou antagônicas (Pedersen e Fenton 2007), com fatores como imunodebilidade atuando como potencializadores de doença clínica no hospedeiro (Telfer et al. 2010, Jansen et al. 2018).

Utilizar diferentes provas diagnósticas também auxilia tal compreensão, visto que, para determinados parasitos, provas diferentes oferecem respostas epidemiológicas distintas, como exposição prévia, infecção subpatente, críptica ou ativa ou mesmo viabilidade do parasito no hospedeiro (Jansen et al. 2018, Santos et al. 2019). Além disso, auxilia na compreensão das estratégias de manutenção de parasitos no ambiente. Essa abordagem de parasitos múltiplos e com distintos testes também reduz falso-positivos por reação cruzada ao se correlacionar os resultados.

A emergência de doenças é favorecida por perturbações ecológicas em grande escala, que impulsionam a mudança de hospedeiros por parasitos generalistas (Frankel et al. 2015). A maioria desses parasitos tem origem infecciosa (Munson 2000), muitos possuindo potencial zoonótico, sendo responsáveis por 60% das parasitoses em humanos (Taylor et al. 2001). Nesse contexto, carnívoros são hospedeiros reservatórios para algumas delas (Ashford 2000, Leighton e Kiuken 2001, Dantas-Torres 2007, Beck et al. 2008, Rocha 2013). Quando capazes de manter a infecção por um determinado parasito, são considerados reservatórios mantenedores; já quando apresentam um perfil de infecção que favorece a transmissão, reservatórios amplificadores (Roque e Jansen 2014). Tais características, porém, são dinâmicas, com hospedeiros mantenedores podendo se tornar amplificadores em situações de imunossupressão e estresse (Rocha 2013).

É importante avaliar a prevalência de parasitos no contexto das características bióticas e abióticas locais (Jennelle et al. 2007). Previsões para o agronegócio no Brasil apontam para expansão de fronteiras agrícolas em mais de 10 milhões de hectares nos próximos 10 anos (Brasil 2019a). Nesses cenários, a modificação da paisagem nativa geralmente está acompanhada do uso de agroquímicos para aumentar a produtividade agrícola, bem como de maior proximidade da fauna silvestre a animais domésticos, especialmente devido à pecuária. Esses aspectos influenciam na dinâmica dos parasitos em uma área, visto o potencial imunodepressor de agroquímicos já comprovado para algumas espécies (Christin et al. 2004) e a

relação das parasitoses de animais silvestres e animais de produção (Bengis et al. 2002). De acordo com Jansen et al. (2018), imunossupressão e coinfeções podem aumentar parasitemia e, conseqüentemente, a possibilidade de transmissão e a prevalência de parasitos em uma área.

A área de estudo deste trabalho se apresenta como um mosaico de lavouras de cultivo de arroz irrigado, soja e milho e áreas de pastagem para gado inserido em matriz de vegetação nativa de pantanal e cerrado. Para o cultivo do arroz, canais de irrigação foram construídos, havendo grande disponibilidade de água também durante o período de seca característico do pantanal (Soriano 1996). Na região, o registro mamíferos por armadilhamento fotográfico nos quadros de arroz, em 2018, foi superior que nas demais áreas, sendo Carnívora a segunda ordem mais registrada, sugerindo que o cultivo de arroz fornece recurso alimentar e hídrico não só para herbívoros como, por cascata trófica, seus predados (Andressa Fraga, *dados não publicados*).

No Brasil, a ordem Carnívora é constituída por 33 espécies (Paglia et al. 2012), com 15 delas ocorrendo na área de estudo (Andressa Fraga, *dados não publicados*), entre animais de médio e grande porte – com peso médio variando entre dois e 20 kg e mais de 20 kg, respectivamente (IUCN 1996, Conner e Morris 2015). Carnívoros possuem grande importância ecológica por regularem populações de suas presas naturais, influenciando toda a dinâmica do ecossistema em que vivem por serem predadores nas teias alimentares (Cheida et al. 2011). De forma geral, possuem amplas áreas de vida e grande longevidade, sendo expostos a grande quantidade de poluentes e parasitos (Mohr e Stumpf, 1964, Lindenfors et al. 2007). Dessa forma, esses animais são considerados bons indicadores da saúde do ambiente dado seu potencial bioacumulador (Rocha et al. 2013; May-Junior et al. 2017). Suas principais ameaças são a supressão de vegetação nativa, construções de estradas e hidrelétricas e mineração (Beisegel 2017), caça (Carvalho-Jr e Morato 2013), redução ou total destruição de habitats (Ripple et al. 2014) e agentes infecciosos (Whiteman 2007; Jorge et al. 2010).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi investigar microparasitos de forma associada a condições de saúde em carnívoros em um mosaico de lavouras de arroz, de pastagem e de mata nativa de pantanal e cerrado. Elegemos carnívoros de médio porte para essa avaliação visto que são bons indicadores de aspectos sanitários em uma área. Entre os parasitos selecionados, demos destaque à *Leptospira* spp. por sua relação a cultivos de arroz irrigado já descrita em outros agrossistemas (Valantin-Morison et al. 2011, Frankel et al. 2015; Amaral 2016). Apresentamos os resultados em dois capítulos:

**1) Infecções múltiplas e o estado de saúde de carnívoros silvestres em ecótono de Pantanal e Cerrado: investigação em um agroecossistema brasileiro;**

**2) Alta prevalência de *Leptospira* spp. em *Leopardus pardalis* e *Cerdocyon thous* (Carnívora) de vida livre em área de agroecossistema no Pantanal de Miranda.**

## Referências

- Amaral, L. L. D. (2016). Leptospirose ocupacional: perfil de trabalhadores da área rural do município de Estrela, RS.
- Ashford RW. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30: 1269-128.
- Beck A, Beck R, Kusak J, Gudan A, Martinkovic F, Artukovic B, Hohsteter M, Huber D, Marinculic A, Grabarevic Z. (2008). A Case of Visceral Leishmaniasis in a Gray Wolf (*Canis lupus*) from Croatia. *Journal of Wildlife Diseases*, 44: 451-456.
- Beisegel BM. (2017). Cumulative environmental impacts and extinction risk of Brazilian carnivores. *Oecologia Australis*. 21(3): 350-360.
- Bengis, R. G., Kock, R. A., & Fischer, J. (2002). Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Revue Scientifique et Technique-Office international des épizooties*, 21(1), 53-66.
- Brasil. (2019). Projeções do Agronegócio: Brasil 2018/19 a 2028/29 projeções de longo prazo / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. Brasília: MAPA/ACE.
- Carvalho-Jr EAR, Morato RG. (2013). Factors affecting big cat hunting in Brazilian protected areas. *Tropical Conservation Science*. 6(2):303-310.
- Cheida CC, Nakano-Oliveira E, Fusco-Costa R, Rocha-Mendes F, Quadros J. (2011). Ordem Carnivora. Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. Mamíferos do Brasil. 2 ed. p. 235- 288.
- Christin, M. S., Menard, L., Gendron, A. D., Ruby, S., Cyr, D., Marcogliese, D. J., ... e Fournier, M. (2004). Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquatic toxicology*, 67(1), 33-43.
- Concone, H. V. B. (2004). Aspectos da dieta alimentar de jaguatirica (*Leopardus pardalis*, Felidae) em um ambiente antropizado no Pantanal de Miranda (Mato Grosso do Sul). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande – MS.
- Conner LM, Morris G. (2015). Impacts of Mesopredator Control on Conservation of Mesopredators and Their Prey. *PLoS ONE*. 10(9): e0137169. doi:10.1371/journal.pone.0137169
- Dantas-Torres F. (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 149: 139–146.
- Frankel VM, Hendry AP, Rolshausen G, Torchin ME. (2015). Host preference of an introduced generalist parasite for a non-native host. *Internacional Journal for Parasitology*. 45: 703-709.
- IUCN (1996). *Wild cats: Status Survey and Conservation Action Plan*. Nowel K, Jackson P. (Ed.). Switzerland: International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources. 382p.
- Jansen, A. M., das Chagas Xavier, S. C., & Roque, A. L. R. (2018). *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites & vectors*, 11(1), 502.
- Jennelle, C.S., Cooch, E.G., Conroy, M.J., Senar, J.C., 2007. State-specific detection probabilities and disease prevalence. *Ecological Applications* 17, 154–167.
- Jorge RSP, Rocha FL, May-Junior JA, Morato RG. (2010). Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. *Oecologia Australis*. 14(3): 686-710.
- Leighton F, Kuiken T. (2001). Leptospirosis. In: Williams ES, Barker IK. (eds). *Infectious diseases of wild mammals*. Iowa State University Press, Ames. Pp.498-502.
- Lindfors, P., Nunn, C. L., Jones, K. E., Cunningham, A. A., Sechrest, W., & Gittleman, J. L. (2007). Parasite species richness in carnivores: effects of host body mass, latitude, geographical range and population density. *Global Ecology and Biogeography*, 16(4), 496-509.

May-Júnior, J. A., Songsasen, N., Azevedo, F. C., Santos, J. P., Paula, R. C., Rodrigues, F. H. G., ... & Morato, R. G. (2009). Hematology and blood chemistry parameters differ in free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) living in the Serra da Canastra National Park versus adjacent farmlands, Brazil. *Journal of wildlife diseases*, 45(1), 81-90.

Mohr, C.O. & Stumpf, W.A. (1964). Relation of tick and chigger infestations to home areas of California meadow mice. *Journal of Medical Entomology*, 1, 73–77.

Munson L. (2000). Scope and magnitude of disease in species conservation. In: Disease risk workshop. Omaha, Nebraska, USA. *Report*. Omaha: Henry Doorly Zoo, p. 15-17.

Paglia, A. P., Da Fonseca, G. A., Rylands, A. B., Herrmann, G., Aguiar, L. M., Chiarello, A. G., ... & Mendes, S. L. (2012). Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2ª Edição/Annotated Checklist of Brazilian Mammals. *Occasional papers in conservation biology*, 6, 1-82.

Pedersen, A. B., & Fenton, A. (2007). Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends in ecology & evolution*, 22(3), 133-139.

Ripple, W. J., Estes, J. A., Beschta, R. L., Wilmers, C. C., Ritchie, E. G., Hebblewhite, M., ... & Schmitz, O. J. (2014). Status and ecological effects of the world's largest carnivores. *Science*, 343(6167), 1241484.

Rocha FL. (2013). A refe trófica e o papel dos carnívoros silvestres (Ordem Carnivora) nos ciclos de transmissão de *Trypanosoma cruzi*. *Tese de Doutorado*. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. RJ.

Rocha, F. L., Roque, A. L. R., de Lima, J. S., Cheida, C. C., Lemos, F. G., de Azevedo, F. C., ... & Jansen, A. M. (2013). *Trypanosoma cruzi* infection in Neotropical wild carnivores (Mammalia: Carnivora): at the top of the *T. cruzi* transmission chain. *Plos one*, 8(7), e67463.

Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), 251-262.

Santos, F. M., Barreto, W. T. G., de Macedo, G. C., da Silva Barros, J. H., das Chagas Xavier, S. C., Garcia, C. M., ... & de Andrade, G. B. (2019). The reservoir system for *Trypanosoma* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) species in large Neotropical wetland. *Acta tropica*, 199, 105098.

Serrano, E., & Millán, J. (2014). What is the price of neglecting parasite groups when assessing the cost of co-infection?. *Epidemiology & Infection*, 142(7), 1533-1540.

Sollberg, I., Schiavetti, A., & Moraes, M. E. B. (2014). Manejo agrícola no refúgio de vida silvestre de uma: agroflorestas como uma perspectiva de conservação. *Revista Árvore*, 38(2), 241-250.

Soriano, B. M. A. (1996). Caracterização climática da sub-região da Nhecolândia, Pantanal-MS. *Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal*, 2.

Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 356: 983-989.

Telfer, S., Lambin, X., Birtles, R., Beldomenico, P., Burthe, S., Paterson, S., & Begon, M. (2010). Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science*, 330(6001), 243-246.

Teribe, R. (2007). Comparações entre taxas de encontro de mamíferos de médio e grande porte em focagens noturnas, em dois períodos sazonais, na Fazenda San Francisco (Pantanal, Miranda–Mato Grosso do Sul).

Valantin-Morison, M., Sarthou, J. P., de Tourdonnet, S., Gosme, M., Bertrand, M., Roger-Estrade, J., ... & Doré, T. (2011). Agroecosystem management and biotic interactions: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 3 (31), 491–514.

Whiteman CC. (2007). Conservação de Carnívoros e a interface homem-fauna doméstica-fauna silvestre numa área fragmentada na Amazônia oriental brasileira. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

## Capítulo 1

### **Infecções múltiplas e o estado de saúde de carnívoros silvestres em ecótono de Pantanal e Cerrado: investigação em um agroecossistema brasileiro**

Manuscrito a ser submetido para *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*

#### **Resumo**

Investigar parasitos em animais silvestres, além de auxiliar a compreensão de como se mantêm na natureza, auxilia na compreensão dos riscos que podem oferecer à saúde de seus hospedeiros, especialmente em casos de coinfeções. Ainda, quando generalistas, podem comprometer animais de produção e humanos que habitam áreas em comum. São escassos, porém, trabalhos que investigam parasitos e a influência das infecções no estado de saúde na fauna silvestre em agroecossistemas do Brasil. Neste estudo, investigamos a ocorrência de 20 parasitos em carnívoros silvestres em mosaico de lavoura de arroz, pastagem e mata nativa de Pantanal e Cerrado no Brasil, com 13 jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) e 12 cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) amostrados. Realizamos provas indiretas por sorologia para 10 parasitos e provas diretas por teste molecular para 10 e cultura para uma família. Também avaliamos as condições de saúde e aspectos hematológicos (hematócrito e 13 parâmetros bioquímicos) dos animais. O total de 14 parasitos foram detectados em pelo menos uma das provas realizadas, sendo nove protozoários, quatro bactérias e um vírus. Todos os animais capturados foram positivos para pelo menos um microparasito. A taxa de coinfeção variou de dois a nove, com 84% dos animais infectados com pelo menos três parasitos. As jaguatiricas apresentaram maiores taxas de coinfeção que os cachorros-do-mato, com médias por espécie de 6,8 ( $\pm 1,5$ ) e 4,3 ( $\pm 1,4$ ) microparasitos, respectivamente. Destacamos os resultados de *Leptospira* e do vírus rábico devido à importância que possuem para saúde pública e economia, bem como a primeira descrição de *Crithidia mellificae* em carnívoros e de *Rangelia vitalli* em vertebrados no Pantanal. Jaguatiricas foram mais parasitadas, especialmente por parasitos transmitidos por carrapatos, e mais afetadas nos aspectos clínicos e laboratoriais que cachorros-do-mato. Esse estudo mostra a importância de se considerar os efeitos da comunidade de parasitos em um hospedeiro, e apresenta altas taxas de coinfeção e baixas condições de saúde dos animais. É possível que as altas prevalências e a baixa condição de saúde estejam relacionadas à alta exposição a agroquímicos na área de estudo, dado seu conhecido efeito imunossupressor. Com a liberação de diversos compostos no Brasil em 2019, é imperativa a ampliação de investigações a respeito de seus impactos na saúde silvestre.

**Palavras-chave:** *Leopardus pardalis*; *Cerdocyon thous*; hemoparasitos; sorologia; diagnóstico molecular.

#### **1. Introdução**

A investigação de parasitos em animais silvestres é importante tanto por auxiliar a compreensão das estratégias para manutenção de seus ciclos, como pelo potencial que possuem de prejudicar a saúde dos hospedeiros. Na fauna silvestre, parasitos podem afetar animais de produção, causando prejuízos à economia, e ao ser humano, especialmente porque cerca de 60% desses parasitos têm origem zoonótica (Funk et al. 2001; Taylor et al. 2001; Junqueira e Alfieri 2006; Jorge et al. 2010). Neste trabalho, consideramos a classificação utilizada por Lindenfors et al. (2007), que subdivide parasitos em macroparasitos (helmintos e artrópodes) e microparasitos (vírus, bactérias, protozoários e fungos).

No hospedeiro, as interações entre parasitos podem ser antagonistas ou benéficas para pelo menos um deles (Pedersen e Fenton 2007), seja por competição por recursos ou devido a debilidades imunológicas (Graham 2008). Em muitos casos, a susceptibilidade a outras infecções aumenta por infecções prévias (Telfer et al. 2010). Na fauna silvestre, coinfeções são muito mais frequentes que infecções simples (Bordes e Morand 2011), e a riqueza de parasitos geralmente é influenciada por fatores ecológicos, a exemplo da densidade

populacional (Lindenfors et al. 2007). Além disso, fator como uso de agroquímicos em uma área também pode influenciar a relação parasito-hospedeiro dado seu potencial imunossupressor já descrito para algumas espécies (Christin et al. 2004).

Os biomas Pantanal e Cerrado, apesar de se destacarem por suas ricas biodiversidades, têm sido bastante impactados pelo agronegócio no Brasil, tendo apenas 5% e 9% de suas áreas, respectivamente, protegidas como Unidades de Conservação (Brasil 2018). Os agrossistemas podem diferir pelo tipo e manejo dos cultivos, pela oferta de recursos alimentar, hídrico e de abrigo para a fauna silvestre, além da proximidade ou não à mata nativa (Valantin-Morison et al. 2011). Ainda que alguns agroecossistemas pareçam favorecer a persistência de espécies silvestres, avaliar o aspecto sanitário dessa fauna é importante especialmente porque paisagens alteradas beneficiam a persistência, também, de parasitos (Frankel et al. 2015).

Nesse sentido, carnívoros são bons objetos de estudo, devido as suas amplas áreas de vida e longevidade, aumentando a exposição a distintos agentes infecciosos (Mohr e Stumpf, 1964; Lindenfors et al. 2007); ao potencial bioacumulador de parasitos generalistas que são transmitidos por via oral (Rocha et al. 2013); e à possibilidade de coletar volume suficiente de amostras para diferentes provas de diagnóstico, atendendo a investigação de múltiplos parasitos (Halliday et al. 2007; Aguirre et al. 2009; Millán et al. 2014).

Considerando o cenário de agroecossistemas no Brasil e que carnívoros são bons indicadores de aspectos sanitários em uma área, o objetivo deste trabalho foi investigar como carnívoros de médio porte estão reagindo às condições ambientais em um mosaico de lavouras de arroz e pastagem inserido em matriz de mata nativa de pantanal e cerrado brasileiros, a partir do levantamento de microparasitos e da avaliação de suas condições de saúde.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Área de Estudo**

O Pantanal, localizado no Brasil, Paraguai e Bolívia, é caracterizado por ser a maior planície alagável do mundo e por sua rica biodiversidade de fauna e flora. De cerca de 15.035.500 ha, possui 60% de sua área em território brasileiro e é dividido em 11 sub-regiões de acordo com características ambientais (Silva e Abdon 1998). Já o Cerrado, segundo maior bioma brasileiro, com 203.199.000 ha, caracteriza-se por ser a savana mais extensa da América do Sul e por ser *hotspot* da biodiversidade global (Sano et al. 2010). Em uma área de ecótono de Pantanal e Cerrado, no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, localiza-se o Pantanal de Miranda. Essa sub-região apresenta fitofisionomia de cerradão, cerrado, mata semidecídua e campo seco (Silva et al. 2000), possui estações de seca (abril a setembro) e cheia (outubro a março) bem definidas (Soriano 1996), precipitação média de 1520 mm/ano e temperatura variando entre 3°C e 46°C.

A área de estudo, um mosaico de vegetação nativa, de lavouras, de pastagens e de floresta plantada de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), é uma propriedade particular de 8.970 ha inserida no Pantanal de Miranda (20°05' S, 56°36' W), tendo o Rio Miranda, a BR 262 e outras propriedades particulares como limites (Fig. 1, 2). Desde 1984, desenvolve-se cultivo de arroz irrigado na região, para o qual se destina cerca de 3.200 ha. A

produção é intensamente manejada e ocorre de acordo com o período chuvoso, de modo a aproveitar a água dos rios, com canais de irrigação que totalizam 13 km de extensão. Parte dos campos de lavoura é alternada para cultivo também de soja e milho. Visando otimizar a produção, realiza-se aeropulverização de agroquímicos como o glifosato e utilizam-se maquinários terrestres e de controle hídrico, manipulados por funcionários diariamente. Para pecuária, são destinados cerca de 2.100 ha, com criação de mais de 2.000 cabeças de gado e 100 equinos, e, para floresta de eucalipto, destina-se cerca de 70 ha. A localidade é conhecida e muito procurada para ecoturismo devido aos avistamentos de animais silvestres em meio às áreas de agropecuária, como mamíferos das Ordens Carnivora, Rodentia e Artiodactyla (Teribele 2007), além de diversas espécies de aves (Concone 2004), recebendo média de 5.000 pessoas por ano. A criação de animais domésticos de estimação, como cães e gatos, é proibida, sendo eventualmente avistados nos limites da fazenda.

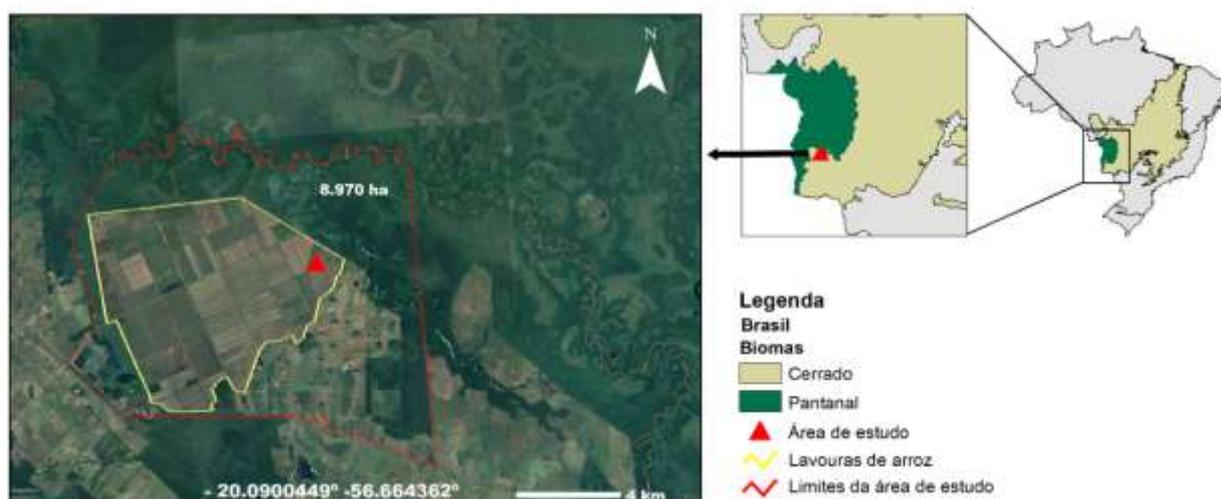


Figura 1: Mapa de local de amostragem de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) evidenciando o contínuo de vegetação nativa acima dos limites da propriedade e a extensão das áreas construídas, em área de ecótono de Pantanal e Cerrado, Mato Grosso do Sul, Brasil.

## 2.2 Captura

As capturas ocorreram entre agosto e dezembro de 2018, com esforço de 541 armadilhas-noite. Utilizamos armadilhas do tipo caixa armada de ferro (150x60x60cm e 115x53x58cm) para carnívoros de médio porte, iscadas com coxa de frango e bacon aquecido e/ou sardinha enlatada, dispostas nos diferentes ambientes da fazenda. Calculamos o sucesso de captura de animais da Ordem Carnivora e das espécies-alvo por meio da fórmula: número de indivíduos capturados\*100/armadilhas-noite (Roque et al. 2008). Anestesiámos os animais com Zoletil 50<sup>®</sup> (8 mg/kg) ou com associação de quetamina 15 mg/kg, xilazina 0,7mg/kg e midazolam 0,5 mg/kg, usando ioimbina como reversor, quando necessário.

## 2.3 Manejo e coleta de amostras

Durante a anestesia, realizamos procedimentos de marcação com brinco de identificação, biometria, pesagem, determinação do sexo e faixa etária a partir da erupção e desgaste dentários, porte e peso (Oliifiers et al. 2010), exame clínico e coleta de sangue, urina e ectoparasitos. Parâmetros vitais foram aferidos a cada 10 minutos. Os procedimentos duraram média de 50 minutos e foram conduzidos por veterinária devidamente registrada com autorização do órgão brasileiro competente (ICMBio/SISBIO 31895) e do Comitê de Ética e Uso Animal da Universidade Federal da Paraíba (7478200418 - ID 000109). Técnicas de biossegurança e

equipamentos de proteção individual foram utilizados durante manejo dos animais e manipulação das amostras biológicas (Sikes 2011). Todos os animais foram liberados no mesmo local de captura após completa recuperação anestésica.

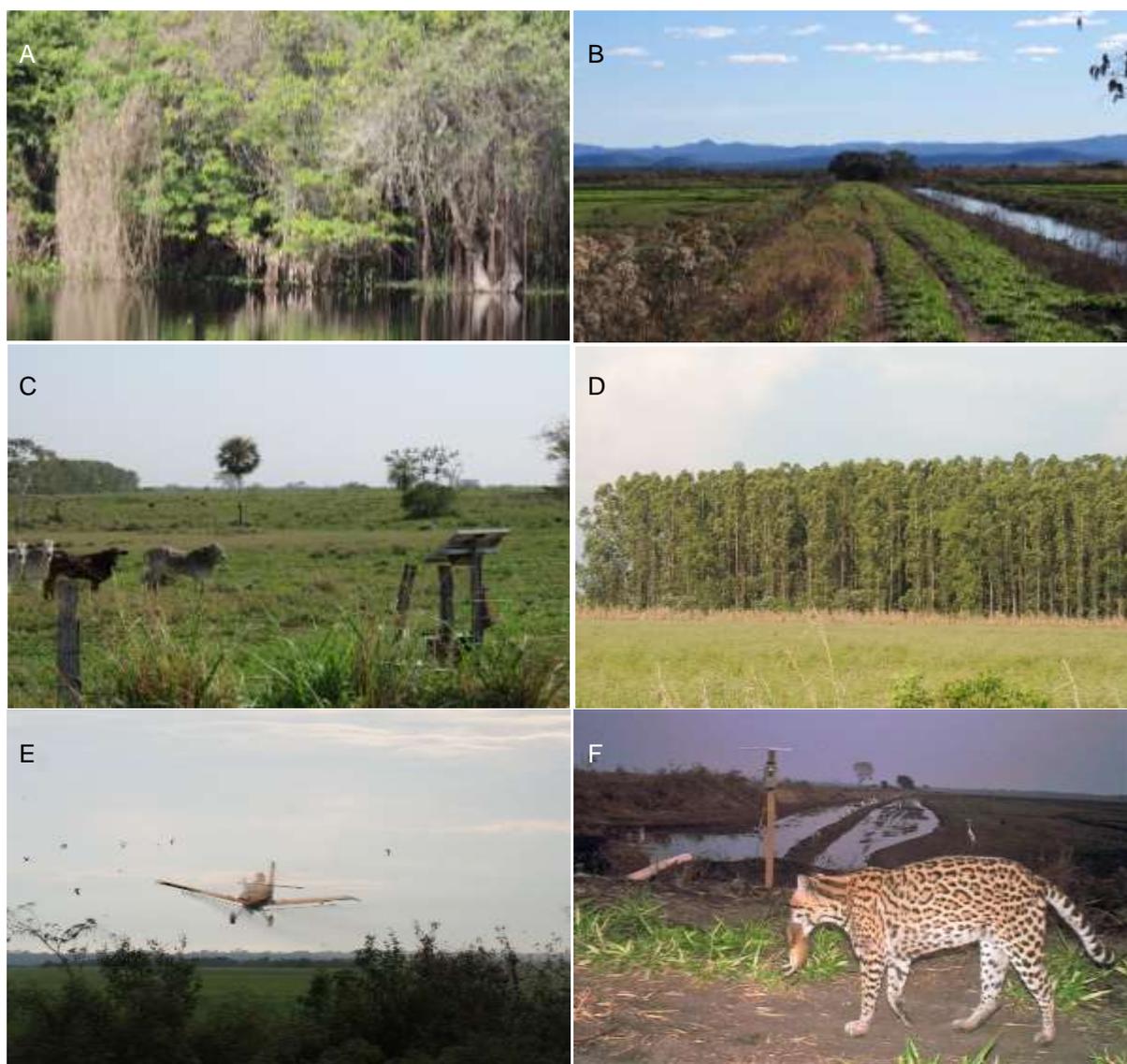


Figura 2: A-D) Mosaico de paisagens em agroecossistema em ecótono de Pantanal e Cerrado, Mato Grosso do Sul, Brasil - A) Vegetação nativa em período chuvoso, B) Lavoura de cultivo de arroz irrigado, C) Pasto para pecuária, D) Floresta plantada de eucalipto (*Eucalyptus globulus*); E) Aeropulverização de agroquímicos em lavouras de arroz; F) *Leopardus pardalis* predando roedor não identificado em lavoura de arroz.

No exame clínico, avaliamos hidratação, coloração das mucosas, pelagem, presença de lesões e de ectoparasitos, dentição e aspectos reprodutivos (glândulas mamárias, vulva e bolsa escrotal). As amostras de sangue foram colhidas por punção das veias cefálica ou jugular em tubos com anticoagulante para análise molecular e parasitológica e sem anticoagulante para teste sorológico e determinação de parâmetros bioquímicos a partir do soro, obtido por centrifugação a 1.300 xg por 15 minutos. Aliquotas de sangue total e soro foram mantidas congeladas a -20°C até análises posteriores. Também coletamos urina de canídeos machos, jovens e adultos, por sonda uretral, para urinálise.

## 2.4 Análises laboratoriais

Avaliamos a ocorrência de pelo menos 20 microparasitos por meio de métodos diretos (moleculares e parasitológicos) e/ou indiretos (sorológicos) (Tabela I). Os parasitos foram selecionados considerando seu potencial zoonótico e risco para saúde humana, importância para a conservação da diversidade e/ou pela capacidade de infectar também animais de pecuária, especialmente os transmitidos por ectoparasitos.

Tabela I: Sumário dos testes utilizados para detecção de hemoparasitos em *Leopardus pardalis* e *Cerdocyon thous* silvestres capturados em 2018 em mosaico de lavouras de arroz, pastagens e área preservada no Pantanal de Miranda, Brasil, com detalhamento das amostras, genes-alvo e primers quando realizada prova molecular, valores de corte quando realizada prova sorológica e meio de cultura em prova parasitológica.

Parasito (Ordem, família, gênero ou espécie)	Amostra	Teste	Gene-alvo e primers (PCR); ponto de corte (sorologia); e meios (cultura)	Fabricante / Referencia
Anaplasmataceae	ST	cPCR	16s rRNA. EHR16SD, EHR16SR	Inokuma et al. 2000
<i>Anaplasma</i> spp.	ST	cPCR <sup>a</sup>	16S rRNA. gE3a, gE10r, gE9f, gE2r	Massung et al. 1998
<i>A. phagocytophilum</i>	Soro	RIFI	≥64	IMUNOTEST®
<i>Ehrlichia</i> spp.	ST	cPCR <sup>a</sup>	<i>dsb</i> . Dsb330, dsb728	Doyle et al. 2005
<i>E. canis</i>	Soro	ELISA <sup>b</sup>	0,305	Machado et al. 1997
		RIFI <sup>c</sup>	≥64	IMUNOTEST®
<i>Hepatozoon</i> spp.	ST	cPCR	18s rRNA. hep900, hep300 18s RNA. hemo1, hemo2	Ujvari et al. 2004 Perkins e Keller 2001
<i>Mycoplasma</i> spp.	ST	cPCR	16S rRNA. Myco16S-322s, HemMycop16S-1420as	Maggi et al. 2013
Piroplasmida				
<i>Babesia</i> spp. <i>Theileria</i> spp. <i>Rangelia</i> spp. <i>Cytauxzoon</i> sp.	ST	cPCR	18S rRNA. BTF1, BTR1, BTF2, BTR2	Jefferies et al. 2007
<i>Cytauxzoon felis</i>	ST	cPCR <sup>c</sup>	18S rRNA. Cy-F, Cy-R	Birkenheuer et al. 2006
<i>Babesia vogeli</i>	Soro	ELISA <sup>b</sup>	0,275	IMUNODOT, Diagnósticos Ltda®
<i>Trypanosomatidae</i>	ST	Cultura	NNN/LIT (Novy-MacNeal-Nicolle/liver)	Santos et al. 2018
	ST	cPCR	18s. rRNA. TRY927F, TRY927R, SSU561F, SSU561R	Noyes et al. 1999
<i>Trypanosoma cruzi</i>	ST	cPCR <sup>d</sup>	24S α rRNA. D71, D72	Souto e Zingales 1993
<i>Trypanosoma evansi</i>	ST	cPCR <sup>d</sup>	DNA satélite. TBR1, TBR2	Masiga et al. 1992
	Soro	RIFI	≥40 (Alves et al. 2011)	IMUNOTEST®
<i>Leishmania infantum</i>	Soro	RIFI	≥40 (Bezerra et al. 2019)	IMUNOTEST®
<i>Leptospira</i>	Soro	SAM	≥100	Galton et al. 1965; Cole et al. 1973
<i>Toxoplasma gondii</i>	Soro	RIFI	≥40	IMUNOTEST®
<i>Neospora caninum</i>	ST	RIFI	≥25 (André et al. 2010a)	IMUNOTEST®
<i>Brucella abortus</i>	Soro	AAT	Amostra 1119-3	Brasil 2006
<i>Bartonella</i> spp.	ST	qPCR	<i>nuoG</i> . F-Bart, R-Bart, TexasRed	André et al. 2016
<i>Lyssavirus</i> (Raiva)	Soro	FAVN	≥0,1	Cliquet et al. 1998
<i>Lentivirus</i> (FIV)	ST	cPCR	<i>Pol</i> , P1F, P2R, P2F, P1R	Troyer et al., 2005
<i>Gammaretrovirus</i> (FeLV)	ST	cPCR	U3(LTR)- <i>gag</i> , U3-F(1) /G-R(1) and U3-F(2)/G-R(2)	Miyazawa e Jarret 1997

ST, sangue total; PCR, Reação em Cadeia da Polimerase (c-PCR convencional; q-PCR em tempo real); RIFI, Reação de Imunofluorescência Indireta; ELISA, Ensaio de Imunoabsorção Enzimática; FAVN, Neutralização do vírus por Anticorpo fluorescente; AAT, Antígeno Acidificado Tamponado; SAM, Teste de Soroaglutinação Microscópica, pela qual foram testados 34 sorovares. FIV, Vírus da Imunodeficiência Felina; FeLV, Vírus da Leucemia Felina. <sup>a</sup> Testadas amostras positivas no teste para a Família Anaplasmataceae; <sup>b</sup> Testadas amostras de *C. thous*; <sup>c</sup> Testadas amostras de *L. pardalis*; <sup>d</sup> Testadas amostras positivas no teste para a Família Trypanosomatidae

Para as PCRs, realizamos extração do DNA com QIAamp DNA Blood kit (QIAGEN®) de acordo com as recomendações do fabricante. Qualidade e concentração do DNA foram mensuradas usando razão de absorvância de 260/280nm (Nanodrop®, Thermo Fisher Scientific). Realizamos PCR de controle interno para confirmar presença de DNA amplificável nas amostras a partir do gene endógeno de mamíferos GAPDH (Birkenheuer et al. 2003). As amostras amplificaram o produto previsto para o GAPDH e apresentaram concentração de DNA que indica sucesso na extração, sendo todas incluídas nas análises moleculares.

Em relação aos testes sorológicos, utilizamos conjugado anti-cão para *C. thous* e anti-gato para *L. pardalis* para Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e para Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (de Sousa et al. 2017a; Tolentino et al. 2019). Os valores de corte para os testes ELISA foram calculados pela multiplicação dos valores de absorvância (VA) dos controles negativos por 2,5. Consideramos positivas na (RIFI) e no Teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) as amostras que apresentaram pelo menos 50% de fluorescência e de aglutinação do campo óptico, respectivamente. Para estes dois testes, realizamos diluição seriada na razão de dois das amostras positivas para obtenção do título final (T). Para o Teste de Neutralização de Vírus por Anticorpo Fluorescente (FAVN), foram considerados positivos os poços com pelo menos uma célula fluorescente. Calculamos o valor de T a partir da leitura de placa de diluições e aplicação de fórmula de Spearman-Kärber. Controles positivos e negativos foram oriundos de animais testados previamente. Para *Brucella* spp. seriam positivas amostras com presença de grumos à leitura em caixa de leitura com luz indireta.

Para teste parasitológico, semeamos, em duplicata, amostras de sangue total em meio de cultura para Tripanosomatídeos, mantidos à temperatura ambiente (~28°C) até posterior avaliação em microscópio óptico. As hemoculturas positivas foram isoladas para caracterização molecular, conforme realizado por Rangel et al. (2019), no Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz (Ana Maria Jansen).

A fim de reduzir a possibilidade de resultados falso-positivos nos testes sorológicos e aumentar a especificidade do resultado, quando um indivíduo foi reagente para *Trypanosoma evansi* e *Leishmania infantum*, consideramos positivo apenas para o parasito com maior título. Para *Hepatozoon* spp., consideramos positivos os animais reagentes em pelo menos um dos protocolos empregados.

Consideramos positivos a nível de ordem e família apenas animais reagentes nesses protocolos moleculares e que não foram positivos a nível de espécie ou gênero.

Para os parâmetros bioquímicos, determinamos as concentrações séricas de ureia, creatinina, albumina, fosfatase alcalina (FA), aspartato transaminase (AST), creatina-quinase (CK e fração CK-MB) e lactato desidrogenase (LDH) por análise em espectrofotômetro BRASMED® com os kits Biotech® e Gold®. Determinamos concentrações de proteínas plasmáticas totais (PPT) por refratômetro. Valores de glicose, colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL) e triglicérides foram estabelecidos por método enzimático-colorimétrico com kit comercial Analisa®. Comparamos os resultados obtidos com valores publicados para as mesmas espécies em vida livre, ou com valores de indivíduos mantidos em cativeiro ou de carnívoros domésticos, quando necessário.

As análises foram realizadas no Laboratório Insana-Una da Universidade Católica Dom Bosco; Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista (Jaboticabal); Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Universidade de São Paulo; Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos da Fundação Oswaldo Cruz; Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do

Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo.

Também realizamos exame químico da urina por meio de tiras reagentes para avaliar presença de leucócitos, nitrito, urobilinogênio, proteína, pH, sangue oculto, densidade, corpos cetônicos, bilirrubina e glicose. Utilizamos dados de cães domésticos como valores comparativos (Mattoso et al. 2012).

## 2.5 Análises estatísticas

Avaliamos frequência dos microparasitos positivos por meio de estatística descritiva. Microparasitos que tiveram tanto *L. pardalis* como *C. thous* positivos tiveram frequências comparadas pelo Teste de Fischer (nível de significância de 95%). Quando  $P < 0,05$ , consideramos que havia diferença significativa entre as espécies. Calculamos taxa de coinfeção (TC) por indivíduo a partir do número de microparasitos que foi positivo de acordo com os critérios estabelecidos. Avaliamos a TC média ( $\pm$ desvio padrão) para cada espécie. Realizamos análise gráfica para comparar as taxas de coinfeção entre as espécies.

Calculamos o índice de escore corporal (ICC) por meio de análise dos resíduos de regressão linear ordinária entre peso (g) e comprimento de cabeça-corpo (mm) (Olifiers et al. 2015), considerando ICC satisfatório quando valor positivo, e baixo ICC quando valor negativo. Não analisamos machos e fêmeas separadamente devido às limitações do tamanho amostral. Os valores de juvenis se ajustaram na reta ( $R^2=0,80$  para *C. thous* e  $R^2=0,71$  para *L. pardalis*) e por isso foram incluídos nas análises. Gestantes e lactantes, contudo, foram excluídas pois tais condições podem afetar o escore corporal independente da taxa de coinfeção.

## 3. Resultados

Capturamos 13 jaguatiricas e 12 cachorros-mato, com sucesso de captura total de 5,7%, sendo 3% para jaguatiricas e 2,7% para cachorros-do-mato. Em relação à condição reprodutiva, uma jaguatirica estava prenhe, e uma fêmea de cachorro-do-mato, lactante (Tabela II).

Entre as jaguatiricas, 10 apresentaram alterações clínicas, sendo desidratação e mucosas hipocoradas os sinais mais ocorrentes (8/13, 61,5%). Como particularidades, uma fêmea apresentou fratura antiga em cauda; outra, abscesso em membro posterior; e outra, inchaço em membro posterior, com evidente assimetria entre ambos. Apenas um indivíduo apresentou ectoparasitos, com baixa infestação. Em relação ao ICC, sete animais foram classificados como magros. Vale destacar que três indivíduos (LVB 04, 05 e 07) com ICC satisfatório foram considerados magros ao exame clínico, sendo um deles considerado o mais debilitado por apresentar também pelagem opaca e fraturas dentárias (LVB 05). Pelas demais características da dentição, esse animal foi considerado o mais senil da amostragem.

Quanto aos cachorros-do-mato, um indivíduo apresentou fezes diarreicas em ampola retal e linfonodo poplíteo ingurgitado (LVB 10), e outro, sinais de desidratação e mucosas hipocoradas (LVB 17). Destacamos a ocorrência de carrapatos, acometendo 83% dos animais, com infestação média a alta em sua maioria. Em relação ao índice de condição corporal, sete animais apresentaram valores negativos, indicando baixo ICC.

Tabela II: Identificação (ID), sexo, faixa etária, medidas biométricas, escore corporal e avaliação física de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) capturados entre agosto e dezembro de 2018 em área de agroecossistema no Pantanal de Miranda, Brasil.

Jaguatirica ( <i>Leopardus pardalis</i> ) (n=13)													
ID	06	07	09	14	22	04	05	11	16	18	20	21	23
Sexo	M	M	M	M	M	F	F	F	F	F	F	F	F
Faixa etária <sup>a</sup>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	J
Peso (kg)	11,8	10,0	11,3	13,5	12,8	9,2	8,0	11,1	10,2	10,5	11,4	7,4	5,5
Comprimento cabeça-corpo (cm)	850	845	950	930	920	865	810	795	800	845	875	755	680
Escore corporal <sup>b</sup>	-0,893	0,245	1,974	-0,074	0,166	1,310	0,768	-1,785	-1,028	-0,106	NR	-0,194	-0,712
Avaliação física <sup>c</sup>	1	3	Ø	1	Ø	Ø	2,3	1,3	1,3	1,3	3,4,6	1,3	1,3

Cachorro-do-mato ( <i>Cerdocyon thous</i> ) (n=12)													
ID	01	10	12	02	15	26	17	25	03	13	19	24	
Sexo	M	M	M	M	M	M	M	M	F	F	F	F	
Faixa etária <sup>a</sup>	A	A	A	J	J	J	F	J	A	A	J	J	
Peso (kg)	8,0	10,6	9,7	7,0	7,1	5,3	3,8	4,2	4,5	8,6	7,8	4,2	
Comprimento cabeça-corpo (mm)	810	8600	845	870	745	695	580	610	680	725	755	615	
Escore corporal <sup>b</sup>	0,403	-0,778	-0,320	2,598	-0,221	0,264	-0,919	-0,575	0,671	NR	-0,614	-0,510	
Avaliação física <sup>c</sup>	6	6	6	Ø	6	6	1,3,6	Ø	6	5,6	6	6	

<sup>a</sup> Faixa etária: A- Adulto; J- Juvenil; F- Filhote

<sup>b</sup> Escore corporal: Valor do resíduo regressão linear ordinária entre peso (g) e comprimento de cabeça e corpo (mm). NR: Não realizado devido às condições reprodutivas

<sup>c</sup> Avaliação física: 1-Desidratação leve; 2-Desidratação moderada; 3-Mucosas hipocoradas; 4-Prenhe; 5-Lactante; 6-Ectoparasitos; Ø- Ausência de alterações físicas em exame clínico

### 3.1 Avaliação das infecções múltiplas

Todos os animais capturados foram positivos para pelo menos um microparasito (Tabela III). A taxa de coinfeção variou de dois a nove, com 84% dos animais infectados com pelo menos três parasitos. As jaguatiricas apresentaram maiores taxas de coinfeção que os cachorros-do-mato, com médias por espécie de 6,8 ( $\pm 1,5$ ) e 4,3 ( $\pm 1,4$ ) microparasitos, respectivamente (Fig. 3).

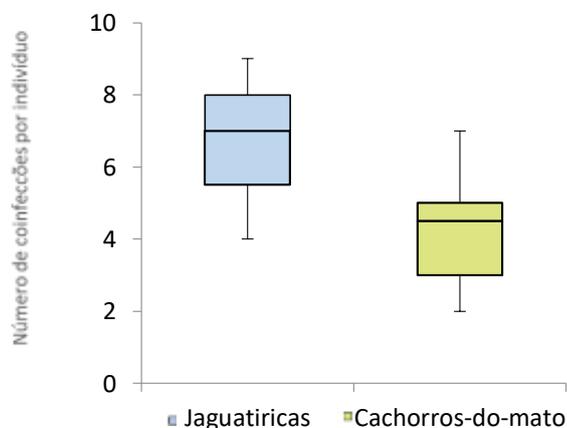


Figura 3: Boxplot dos valores de taxas de coinfeção por indivíduos de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (n=13) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (n=12) amostrados em área de agroecossistema no Pantanal de Miranda, Brasil. Os retângulos representam o intervalo interquartil, incluindo o valor da mediana (linha). Os extremos, os valores máximos e mínimos obtidos.

Tabela III: Lista de microparasitos (Ordem, família, gênero ou espécie) testados\* em jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) em região de agroecossistema no Pantanal de Miranda, Brasil. As cores indicam positividade aos testes (azul: molecular; amarelo: sorológico; cinza: parasitológico). x: resultado não considerado devido à positividade a nível de gênero ou espécie ou por possibilidade de reação cruzada; T: total; NR: não realizado.

Parasitos	Jaguatirica ( <i>Leopardus pardalis</i> ) (n=13)													Cachorro-do-mato ( <i>Cerdocyon thous</i> ) (n=12)												Total				
	ID	06	07	09	14	22	04	05	11	16	18	20	21	23	T	01	10	12	02	15	26	17	25	03	13		19	24	T	
Anaplasmatacea															2														0	2
<i>Anaplasma</i>															2														-	2
<i>Erichia</i>															-														1	1
<i>Erichia canis</i>															-														4	4
<i>Hepatozoon</i>															13														11	24
<i>Mycoplasma</i>															12														2	14
Piroplasmida															-														2	2
<i>Rangelia vitalli</i>															-														1	1
<i>Cytauxzoon felis</i>															10														-	10
<i>Babesia vogeli</i>															-														1	1
Trypanosomatidae															-														3	3
<i>Trypanosoma cruzi</i>															10														2	12
<i>Trypanosoma evansi</i>															1														-	1
<i>Leishmania infantum</i>															10														-	10
<i>Crithidia mellificae</i>															1														3	4
<i>Leptospira</i>															9														8	17
<i>T. gondii</i>															7														2	9
<i>Lyssavirus</i>															13														12	25
<b>Taxa de coinfeção</b>																														
		7	5	7	8	7	8	9	7	5	9	6	6	4		7	5	5	6	4	3	5	3	4	5	3	2			

\* Microparasitos testados para os quais nenhum animal foi reagente: *Anaplasma phagocytophilum*, *Neospora caninum*, *Brucella abortus*, *Bartonella* ssp., vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV).

Dos 20 microparasitos testados, 14 foram detectados em pelo menos um dos animais amostrados. Avaliamos o intervalo de títulos (T) e de valores de absorvância (VA) obtidos quando realizados os testes sorológicos RIFI e ELISA, respectivamente. Entre os parasitos de maior ocorrência, destacamos o vírus da raiva (T=0,1-0,5), *Hepatozoon* spp. (detecção molecular, DM) e *Leptospira* spp. (T=200-6400), acometendo 100%, 96% e 68% dos animais, respectivamente. Três parasitos foram detectados apenas nas jaguatiricas, sendo eles *Anaplasma* spp. (DM), *T. evansi* (T=320) e *L. infantum* (T=40-320, com 8/25 dos animais testados apresentando T>80), além de *C. felis* (DM), só testado nessa espécie. Em contrapartida, os gêneros *Ehrlichia* (VA=0,36-0,67), *Babesia* (VA=0,30) e *Rangelia* (DM) foram detectados exclusivamente nos cachorros-do-mato. Jaguatiricas foram significativamente mais acometidas por *T. cruzi* (p=0,004) e *Mycoplasma* spp. (p=0,0002) que cachorros-do-mato. *T. gondii* foi detectado em ambas as espécies.

Obtivemos isolamento do tripanosomatídeo *Crithidia mellificae* por hemocultura em quatro indivíduos, identificado a partir de sequenciamento do gene 24S. Quanto aos piroplasmídeos, o sequenciamento indicou similaridade à *C. felis* (99%) e *R. vitalli* (100%) para jaguatirica e cachorro-do-mato, respectivamente. Os demais produtos apresentaram picos duplos em eletroferograma e não foram incluídos na análise.

Seis parasitos testaram negativo em todos os indivíduos, sendo eles *Theileria*, *Bartonella*, *Brucella abortus*, *Neospora caninum*, vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV).

### 3.2 Avaliação bioquímica e hematócrito

Entre os resultados bioquímicos, destacamos 7/13 jaguatiricas apresentando hipoproteïnemia; 17/25 dos animais amostrados apresentando hipoalbuminemia, com valores entre 0,2 e 1,5 g/dL; e sugerimos disfunção renal para o indivíduo LVB 11 pelo alto valor de creatinina, e para os indivíduos LVB 14 e 23 pelos valores moderadamente aumentados de creatinina associados a aumento de ureia (Tabela IV). Em relação aos valores de hematócrito, consideramos apenas o animal LVB 23 com valor discretamente reduzido, visto que filhotes e jovens apresentam fisiologicamente percentuais inferiores a adultos (Lourenço et al. 2012). Valores de glicose, colesterol, lipoproteínas de alta densidade e triglicérides foram apresentados de forma descritiva por serem influenciados por dieta.

### 3.3 Avaliação urinária

Apresentamos os resultados de urinálise de forma descritiva, tendo em vista que as alterações verificadas podem ser decorrentes de estresse de captura (mioglobínúria e proteinúria) ou jejum prolongado (cetonúria) (Garcia-Navarro 1996, Hendrix 2005) (Tabela V).

Tabela IV: Hematócrito (Ht) e parâmetros bioquímicos avaliados em jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) em região de agroecossistema no Pantanal de Miranda, Brasil. Os valores em negrito indicam os resultados fora do intervalo de valores comparativos (VC) adotados.

	ID	Ht (%)	Parâmetros bioquímicos												
			Creat (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	FA (UI/L)	PPT (g/dL)	Alb (g/dL)	AST (UI/L)	LDH (UI/L)	CK (UI/L)	CK-MB (UI/L)	Glicose (mg/dL)	Col total (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Triglic (mg/dL)
Jaguatirica ( <i>Leopardus pardalis</i> )	06	35	0,5	<b>42,4</b>	<b>11,6</b>	7,7	2,3	88,1	<b>476</b>	<b>2354</b>	385,5	110	55	55,4	5
	07	40	<b>1,3</b>	28,6	21,9	<b>5,8</b>	<b>3,1</b>	<b>154,2</b>	<b>636</b>	2198	995,3	72	65	52,8	26
	09	35	<b>1,7</b>	30,8	22,2	8,0	<b>0,3</b>	41,4	<b>547</b>	<b>314</b>	168,4	76	46	43,1	8
	14	37	<b>3,1</b>	<b>15,8</b>	<b>54,3</b>	<b>6,2</b>	<b>1,1</b>	<b>157,2</b>	<b>997</b>	<b>3177</b>	219,1	85	57	40,0	29
	22	39	<b>1,6</b>	<b>22,0</b>	<b>13,0</b>	<b>6,6</b>	<b>0,2</b>	<b>220,9</b>	<b>1101</b>	<b>7901</b>	1640,8	116	92	51,6	14
	04	38	<b>1,1</b>	28,6	<b>17,2</b>	<b>7,5</b>	<b>2,0</b>	<b>139,6</b>	2899	2217	1224,9	100	42	45,7	6
	04	<b>30</b>	<b>1,4</b>	36,1	<b>15,8</b>	8,1	<b>2,1</b>	41,6	<b>884</b>	<b>355</b>	130,5	90	71	46,3	15
	05	36	<b>1,5</b>	<b>23,4</b>	<b>19,8</b>	<b>6,8</b>	<b>1,5</b>	<b>31,7</b>	<b>447</b>	<b>180</b>	30,2	131	47	30,6	13
	11	37	<b>1,6</b>	<b>55,9</b>	<b>19,6</b>	8,2	<b>0,3</b>	65,4	<b>1220</b>	<b>494</b>	180,0	65	34	51,1	18
	16	38	<b>1,1</b>	30,2	<b>18,7</b>	<b>6,2</b>	<b>1,5</b>	104,9	<b>493</b>	1666	233,3	95	55	37,9	37
	18	34	<b>0,7</b>	<b>101,1</b>	23,8	9,8	<b>1,8</b>	66,7	<b>190</b>	1394	356,5	133	48	40,5	37
	20	34	<b>1,5</b>	<b>23,0</b>	<b>9,3</b>	8,1	<b>0,4</b>	40,1	<b>318</b>	<b>395</b>	86,8	116	56	48,4	15
	21	31	<b>1,0</b>	31,7	22,2	<b>6,6</b>	<b>0,6</b>	<b>34,1</b>	<b>155</b>	<b>591</b>	148,9	91	86	39,4	20
23	<b>20</b>	<b>1,3</b>	<b>41,6</b>	27,8	<b>5,0</b>	<b>0,4</b>	<b>38,8</b>	<b>307</b>	<b>2567</b>	541,4	167	87	53,2	17	
VC <sup>a</sup>	31-41 <sup>1</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>2</sup>	31,7 ± 4,4 <sup>2</sup>	27,4 ± 6,8 <sup>2</sup>	8,9 ± 1,3 <sup>2</sup>	2,5 ± 0,2 <sup>2</sup>	91,9 ± 52,7 <sup>2</sup>	3206 ± 1877 <sup>2</sup>	1461 ± 854,7 <sup>2</sup>	-	148 ± 41 <sup>1</sup>	27,0 ± 5,0 <sup>2</sup>	12,0 ± 3,0 <sup>2</sup>	4,9 ± 3,1 <sup>2</sup>	
Cachorro-do-mato ( <i>Cerdocyon thous</i> )	01	42	0,7	<b>12,6</b>	25,5	<b>4,3</b>	<b>0,9</b>	<b>156,1</b>	<b>94</b>	<b>2723</b>	393,7	88	85	37,1	9
	10	41	1,1	<b>19,3</b>	<b>19,2</b>	6,5	<b>0,3</b>	<b>17,9</b>	<b>73</b>	<b>907</b>	60,3	81	40	48,1	18
	12	<b>36</b>	0,7	<b>17,4</b>	<b>13,2</b>	7,7	<b>0,3</b>	<b>68,4</b>	<b>83</b>	287	223,3	70	46	61,2	20
	02	43	1,1	<b>17,6</b>	<b>18,2</b>	<b>3,9</b>	<b>1,4</b>	<b>109,1</b>	<b>113</b>	<b>1510</b>	539,1	56	46	42,7	8
	15	43	<b>1,5</b>	<b>15,5</b>	<b>15,4</b>	5,6	2,9	<b>57,6</b>	<b>359</b>	<b>187</b>	113,6	133	43	33,3	29
	26	<b>34</b>	0,9	<b>12,6</b>	25,9	5,6	<b>0,4</b>	<b>68,7</b>	<b>134</b>	<b>376</b>	204,2	104	54	48,9	18
	17	<b>34</b>	0,7	<b>12,7</b>	77,2	5,8	<b>1,7</b>	42,0	<b>102</b>	<b>1404</b>	338,6	78	79	46,9	22
	25	<b>32</b>	<b>0,3</b>	<b>17,2</b>	21,9	6,6	<b>0,2</b>	41,3	<b>147</b>	<b>819</b>	247,6	97	83	61,9	18
	03	<b>52</b>	<b>1,5</b>	30,7	20,5	<b>5,3</b>	2,6	<b>277,4</b>	<b>64</b>	<b>2070</b>	708,1	51	39	38,9	19
	13	43	<b>0,3</b>	<b>10,9</b>	42,8	6,1	<b>1,9</b>	<b>109,5</b>	<b>910</b>	<b>1106</b>	198,1	109	51	42,9	29
	19	44	1,1	49,0	52,5	6,2	<b>0,3</b>	53,4	<b>64</b>	295	198,9	89	71	53,3	43
	24	<b>33</b>	0,5	<b>14,4</b>	31,3	6,0	<b>0,3</b>	50,9	213	<b>447</b>	256,6	76	83	59,8	39
	VC <sup>b</sup>	38 - 49 <sup>4</sup>	0,4 - 1,2 <sup>4</sup>	22,5 - 71,8 <sup>4</sup>	20 - 156 <sup>5</sup>	5,5 - 7,0 <sup>4</sup>	2,4 - 4,0 <sup>4</sup>	19-54 <sup>4</sup>	169,8 - 255,4 <sup>6</sup>	205,3 - 324,7 <sup>6</sup>	-	85 - 132 <sup>4</sup>	24,2 - 27 <sup>6</sup>	-	22-37 <sup>6</sup>

ID, número de identificação individual; Creat, creatinina; FA, fosfatase alcalina; PPT, proteínas plasmáticas totais; Alb, albumina; AST, aspartato transaminase; LDH, lactato desidrogenase; CK, creatinaquinase; CK-MB, creatinaquinase-MB; Col. total, colesterol total; HDL, lipoproteínas de alta densidade; Triglic, triglicerídeos. <sup>a</sup> Referências dos VC (média e desvio padrão): <sup>1</sup>Adania et al. 2014; <sup>2</sup>Widmer et al. 2016; <sup>3</sup>Viana 2003; <sup>b</sup> Referências dos VC (valores mínimo e máximo): <sup>4</sup>Gomes 2007; <sup>5</sup>Moreira et al. 2009; <sup>6</sup>May-Jr et al. 2009

Tabela V: Urinálise química realizada em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) machos capturados entre agosto e dezembro de 2018 em mosaico de lavouras, pastagens e vegetação nativa no Pantanal de Miranda, Brasil.

ID	Leu	Nit	Uro	Pro	pH	Blo	SG	Ket	Bil	Glu
01	0	0	0,2	+++	7	+++	1.020	5	+	0
10	0	0	0,2	+	7	0	1.020	0	0	0
12	0	0	0,2	+	7	0	1.015	5	0	0
15	0	0	0,2	+	6	+	1.015	0	0	0
VC <sup>1</sup>	0-7	0	0	Até +	5,0-7,5	0	1.015-1.045	0	Até +	0

ID-Número de identificação individual; Leu-Leucócitos; Nit-Nitrito; Uro-Urobilinogênio; Pro-Proteínas; Blo-Sangue; SG-Densidade; Ket-Corpos cetônicos; Bil-Bilirrubina; Glu-Glicose; VC-Valor comparativo. <sup>1</sup> Bastos e Bicalho (2003)

#### 4. Discussão

Este trabalho avaliou a ocorrência de 20 microparasitos concomitantemente em jaguatiricas e cachorros-do-mato em região de agroecossistema no Pantanal de Miranda por meio de testes sorológicos, parasitológicos e moleculares. Ainda, avaliamos a saúde dos animais por meio da combinação de observações clínicas, parâmetros bioquímicos, hematócrito e índice de condição corporal. Encontramos altas taxas de coinfeção, variando de dois a nove agentes por indivíduo, sendo as jaguatiricas mais coinfectadas que cachorros-do-mato em média. Os microparasitos de maior destaque foram o vírus da raiva e a bactéria *Leptospira* spp., ambos de importância para conservação, economia e/ou saúde pública (Lilenbaum et al. 2004; WHO 2005; Costa et al. 2015; Ellis 2015; Vieira et al. 2016). Apresentamos a primeira descrição de *Crithidia mellificae* em carnívoros e o primeiro relato de *Rangelia vitalli* em vertebrados no Pantanal. A avaliação das coinfeções e do conjunto de parâmetros citados indica que a maioria dos indivíduos avaliados não está em boas condições de saúde.

Dos sete parasitos transmitidos por carrapatos detectados, cinco (*Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Hepatozoon*, *Mycoplasma* e *Cytauxzoon*) são reportados aqui com as maiores prevalências em jaguatiricas e cachorros-do-mato de vida livre no Brasil (Criado-Fornelio et al. 2006; Metzger et al. 2008; Almeida et al. 2013; de Sousa et al. 2017a, 2017b, 2017c, 2018), indicando que a área de estudo fornece boas condições para a persistência de hemoparasitos, conforme previamente sugerido por Rahgavan et al. (2014). Provavelmente, a abundância de vertebrados silvestres e a criação de bovinos garantem grandes populações dos carrapatos vetores (Ramos et al 2014; 2016). Considerando que a pecuária é a principal atividade econômica no Pantanal (Araujo et al. 2018), nossas maiores prevalências quando comparadas a outros estudos no próprio bioma podem ser consequência, além das maiores populações de ectoparasitos, de imunodebilidade e consequente aumento da parasitemia (Alvarado-Rybak et al. 2016), visto que essas prevalências foram obtidas, em sua maioria, em provas moleculares. Vale mencionar a baixa detecção de ectoparasitos nas jaguatiricas capturadas, levantando a possibilidade de vias alternativas de transmissão dos hemoparasitos, a exemplo da via oral para *Hepatozoon* spp. (Smith 1996). De toda forma, nosso resultado mostra que a ausência de carrapatos ao exame clínico não está relacionada à infecção por tais hemoparasitos na espécie. Ainda, detectamos um cachorro-do-mato infectado com *Rangelia vitalli*, sendo este o primeiro relato em vertebrados no Pantanal. Esse parasito pode resultar em severa doença hemorrágica em canídeos, especialmente quando coinfectados (Silveira et al. 2016). Todavia, sua ocorrência ainda é pouco investigada no Brasil, havendo relatos de positividade na região Sul e um relato no estado de Minas Gerais (Soares et al. 2011, 2015; Lemos et al. 2012; de Quadros et al. 2015; Fredo et al. 2015; Gottlieb et al. 2016; Malheiros et al. 2016; Silveira et al. 2016; Silva et al. 2019; de Souza et al. 2019). Assim, sugerimos sua investigação em futuros estudos epidemiológicos devido ao potencial impacto na saúde dos canídeos.

Todas as jaguatiricas que apresentaram mucosas hipocoradas e/ou hematócrito reduzido foram positivas para *Mycoplasma* spp. (7/12), *Hepatozoon* spp. (8/13), *C. felis* (5/10) e/ou para família Anaplasmataceae (4/4), o que poderia justificar tais alterações, uma vez que, excetuando-se *Hepatozoon* spp., todos parasitam eritrócitos. Apesar de hepatozoonose ser incomum em animais silvestres (André et al. 2010b), a doença pode causar palidez de mucosas em animais domésticos (Mundim et al. 2008) e por isso achamos importante incluir este parasito nessa discussão. De toda forma, em nosso trabalho a infecção por *Hepatozoon* spp. foi acompanhada por pelo menos um desses outros três parasitos em todos os animais com sinais de

anemia. Por outro lado, os cinco animais que foram soropositivos para *Erlichia* spp. e *Babesia* spp. e não apresentaram sinais de anemia foram PCR-negativo para parasitos da família Anaplasmataceae e da ordem Piroplasmida. Esses resultados sugerem exposição prévia, podendo justificar a ausência de sinais clínicos. Além das alterações em células vermelhas, esses parasitos também poderiam justificar alterações bioquímicas como hipoalbuminemia, aumento de AST, creatinina e ureia (Santiago 2010; Frontera et al. 2013). Apesar de relacionados ao estresse de captura (Widmer et al. 2016), os valores elevados de CK e LDH também poderiam ser justificados pela positividade para *Hepatozoon* spp. (Baneth et al. 1998).

Outro parasito de destaque nesse estudo foi a *Leptospira* spp., tanto pela alta prevalência como pelos altos títulos obtidos. A bactéria é intracelular oportunista, de persistência favorecida em ambientes alagados (Fajriyah et al. 2017). Uma vez no hospedeiro, possui tropismo para o rim, podendo causar falência do órgão (Langston e Heuter, 2003; Greene et al., 2006). Em nosso trabalho, realizado em área com extensos canais de irrigação, dois dos três animais considerados nefropatas pelos valores aumentados de ureia e creatinina foram soropositivos para a *Leptospira* spp. Vale mencionar que creatinina é considerada um marcador tardio de lesão renal (Forterre et al. 2004), e que outros seis animais soropositivos apresentaram valores discretos a moderadamente aumentados para a substância, podendo já sugerir alguma disfunção do órgão. Além disso, a severa hipoalbuminemia apresentada por muitos animais pode estar relacionada também à nefropatia. Apesar de muitas vezes inaparente, especialmente em felinos, carnívoros silvestres podem desenvolver a leptospirose (Lilenbaum et al. 2004). Além disso, ao poderem eliminar o parasito pela urina (da Silva et al. 2015; Vieira et al. 2016; Fornazari et al. 2018) e contaminar o ambiente, a infecção de animais silvestres pode afetar a economia devido especialmente aos danos reprodutivos em animais de produção (Ellis 2015).

Entre os tripanosomatídeos, detectamos a ocorrência de parasitos de três gêneros: *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Crithidia*. Entre eles, *T. cruzi* e *T. evansi* são comuns em espécies silvestres, especialmente no Pantanal (Jansen et al. 2018; Santos et al. 2019). Em carnívoros, *T. evansi* pode causar importante anemia, potencializada em casos de coinfeção com *T. cruzi* (Santos et al. 2018), como observado no único indivíduo positivo em nosso estudo (LVB 18), coinfectado por *T. cruzi*, que apresentou sinal de anemia por palidez de mucosas. Quanto a *T. cruzi*, obtivemos a maior prevalência para jaguatiricas de vida livre quando comparado aos resultados encontrados por Herrera et al. (2011), Rocha et al. (2013) e Santos et al. (2018), sugerindo constante reinfeção dada sua geralmente curta parasitemia nessas espécies (Rocha et al. 2013). Os animais positivos na PCR e que não foram positivos na cultura para o parasito caracterizam infecção críptica (Santos et al. 2019), garantindo a presença do parasito no ambiente. A positividade para *T. cruzi* tem especial importância pela sua capacidade de infectar todas as células de mamíferos (Jansen et al. 2018), causando especialmente danos cardíacos (Guedes et al. 2007). Vale ressaltar que alterações em CK-MB e AST que encontramos, ainda que também possam ser consequência do estresse de captura, podem indicar cardiopatia.

Em relação à *Leishmania* spp., a detecção de 10 jaguatiricas positivas enquanto todos os cachorro-domato foram negativos foi um resultado inesperado, visto que este parasito é mais comumente associado a canídeos (Dantas-Torres 2009, Almeida et al. 2018). É importante mencionar que anticorpos de outros tripanosomatídeos podem reagir no teste sorológico para *Leishmania* spp. e causar reação cruzada (Matos et al. 2015). Assim, a realização de prova sorológica para *T. evansi* foi uma forma de aumentar a especificidade desses resultados – com isso, um animal (ID 18) não foi considerado positivo para *Leishmania* spp. devido ao maior título para *T. evansi*. Tendo em vista que todos os animais positivos para *Leishmania* spp. também

reagiram no teste molecular para *T. cruzi*, questionamos se o resultado foi decorrente de reação cruzada com este tripanossomatídeo ou se, de fato, representa coinfeção, especialmente diante dos altos títulos encontrados (6/10 indivíduos com  $T > 160$ ). Por ser um importante resultado para compreensão do papel dos felinos silvestres nos ciclos de transmissão do parasito, recomendamos a realização de sorologia para *T. cruzi* a fim de excluir a possibilidade de resultados falso-positivos. Esse caso mostra a necessidade de cautela ao afirmar ocorrência de determinado parasito em uma área, especialmente em estudos que investigam número restrito de parasitos, reduzindo a possibilidade de conclusões equivocadas, sendo uma das vantagens da análise de parasitos múltiplos.

Outro achado inesperado foi o isolamento em cultura de *Crithidia mellificae* em três cachorros-do-mato e uma jaguatirica, sendo, até onde sabemos, o primeiro relato em carnívoros. Esse é um parasito descrito como monoxênico de insetos (Killick-Kendrick et al. 1979) que até o momento só foi descrito, em vertebrados, em morcegos (Rangel et al. 2019). Estes autores sugeriram que a transmissão tenha se dado por ingestão de alimentos com resquícios de pólen infectado ou mesmo por lambadura da pele após picada de abelha infectada, possíveis vias de infecção também para os animais positivos em nosso trabalho, especialmente entre os cachorros-do-mato visto sua alimentação onívora. Esse resultado aponta que há muito a se conhecer sobre a diversidade de tripanossomatídeos em animais silvestres (Rocha et al. 2013, Rodrigues et al. 2019), ainda que possa não haver relevância clínica.

Para o vírus da raiva, todos os animais amostrados foram soropositivos com títulos baixos, indicando exposição. Considerando que a produção de anticorpos é influenciada por fatores como quantidade de antígeno, via de transmissão e estado de saúde do hospedeiro (Moore e Hanlon 2010), supomos, diante de casos rábicos no rebanho na região (*comunicação pessoal*), que a exposição dos animais tenha ocorrido por ingestão de carcaças bovinas infectadas. Quando por via oral, a infecção resulta na persistência de anticorpos (Zhang et al. 2008). Vale destacar que estudo concomitante com armadilhamento fotográfico na área registrou pelo menos 17 dos 25 animais amostrados após 120 dias das capturas (Henrique Concone, *dados não publicados*), período máximo de latência do vírus proposto para cães (Brasil 2017). Isso reforça nossa hipótese de exposição sem desenvolvimento da doença e aponta para uma grande circulação do vírus na região.

Nossos resultados mostraram que todos os indivíduos foram infectados por pelo menos dois parasitos, reforçando que coinfeções são mais comuns que infecções únicas (Bordes e Morand 2011, Serrano e Millan 2014). Negligenciar a comunidade de parasitos em um hospedeiro é um risco pois afeta a interpretação dos resultados – a exemplo do animal que não foi considerado positivo para *Leishmania infantum* por apresentar título mais alto para *T. evansi*. Além disso, não considerar a comunidade de parasitos também impossibilita a compreensão dos efeitos das infecções. Isso porque a relação da comunidade de parasitos com o hospedeiro pode ter efeito sinérgico ou antagônico (Cox 2001, Loker e Hofkin 2015), variando de acordo com as espécies que compõem tal comunidade e com a competência imunológica do hospedeiro frente a isso. Em muitos casos, as coinfeções aumentam a susceptibilidade a outros parasitos.

Adicionalmente, a utilização de diferentes métodos de diagnóstico para um mesmo parasito é uma estratégia para obtenção de respostas epidemiológicas distintas. Um exemplo é o caso de *Leishmania*, visto que teste sorológico indica exposição prévia, PCR de amostra sanguínea indica infecção aguda dada a parasitemia, e isolamento indica viabilidade do parasito (Roque e Jansen 2014). Essa abordagem auxilia na compreensão do complexo quebra-cabeças dos ciclos de transmissão em uma área e do papel que cada

espécie hospedeira desempenha nestes ciclos. Além disso, pode-se ampliar, por consequência, a prevalência obtida de um parasito em uma população ao se detectar indivíduos em diferentes estágios da infecção, resultado que observamos para todos os parasitos em que realizamos provas distintas.

Avaliando o panorama das infecções por espécie, jaguatiricas foram em média 50% mais coinfectadas que cachorros-do-mato. Sugerimos três possíveis explicações para esse resultado: (i) biologia dos parasitos – no caso do *Mycoplasma* spp., felinos são carreadores crônicos e geralmente com alta parasitemia (Willi et al. 2006) e a detecção em canídeos é difícil (André 2012); (ii) modo de transmissão – no caso dos parasitos transmitidos por via oral, como *T. cruzi* (Rocha et al. 2013) – sendo carnívoras estritas enquanto cachorros-do-mato alternam a dieta entre frutos e pequenos vertebrados (Tirelli et al. 2019), jaguatiricas estariam mais propícias à bioacumulação pela maior possibilidade de predação de animais infectados; e (iii) também por consequência da dieta carnívora estrita, felinos não acumulam reservas energéticas em forma de gordura de forma preventiva, sendo mais sensíveis a infecções e a baixa de imunidade, o que também é causa de aumento de parasitemia e poderia justificar suas maiores detecções nas provas moleculares de amostras sanguíneas (George et al. 2002, Langston e Heuter, 2003, Harrus et al. 2002, Kubo et al. 2006, East et al. 2008, Serrano e Millán 2014, Alvarado-Rybak et al. 2016, Pennisi e Persichetti 2018).

É importante avaliar a prevalência de parasitos no contexto das características bióticas e abióticas locais (Jennelle et al. 2007). Em nossa área de estudo, além da criação de animais domésticos, das amplas lavouras e dos extensos canais de irrigação distribuídos, faz-se uso de agroquímicos. Ainda assim, a área é reconhecida pela visualização de carnívoros silvestres, possivelmente devido à oferta alimentar – pequenos mamíferos atraídos pelo arrozal (Henrique Concone, *estudo em andamento*). Nossa taxa de captura de jaguatiricas, a maior já descrita para a espécie mesmo sem uso de isca viva, com até três indivíduos amostrados no mesmo ponto, sugere que os animais, de fato, são abundantes nessas áreas alteradas. Se, por um lado, o agroecossistema parece favorecer a manutenção dos animais, por outro, o aumento de populações hospedeiras e a imunodepressão gerada pela exposição a agroquímicos também poderiam implicar em aumento da taxa de transmissão de parasitos (Scott, 1988; Dobson e Foufopoulos 2001; Christin et al. 2004; Jansen et al. 2018).

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho referentes a aspectos clínicos e bioquímicos, bem como parasitológicos, apontamos que os animais amostrados não apresentam boas condições de saúde, especialmente as jaguatiricas, sendo possivelmente prejudicados pelos impactos gerados pelo agronegócio. A liberação de mais de 353 agrotóxicos no Brasil apenas em 2019 (Brasil 2019b) vai de encontro ao conceito de Saúde Única que envolve a agroecologia como ferramenta de promoção de saúde humana e animal (VSF International 2014). Nesse sentido, seriam exemplos de medidas mitigatórias a redução de uso e mesmo desuso de agrotóxicos, uso de ingredientes ativos menos persistentes e tóxicos, aumento da biodiversidade e aplicação de medidas para a conservação do solo (VSF International 2014, de Carvalho Dores 2015, Pignati et al. 2018).

**Agradecimentos:** CAPES pelo auxílio financeiro de quatro bolsistas; apoio local e estrutural da Fazenda; Laboratório de Mamíferos da Universidade Federal da Paraíba; Laboratório Insana-Una da Universidade Católica Dom Bosco; Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista; Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Universidade de São Paulo; Laboratório de Biologia de

Tripanosomatídeos da Fundação Oswaldo Cruz; Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo.

## Referências

Adania, C. H., Silva, J. C. R. & Felipe, P. A. N. (2014). Carnívora – Felidae (Onça, Suçuarana, Jaguatirica e Gato-do-mato). In: Cubas, Z. S., Silva, J. C. R. & Catão-Dias, J. L. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. São Paulo: Roca, 864-906.

Aguirre, A. A. (2009). Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. *Parasites & vectors*, 2(1), S7.

Almeida, A. P., Souza, T. D., Marcili, A., & Labruna, M. B. (2013). Novel Ehrlichia and Hepatozoon agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 50(3), 640-646.

Almeida, J. C., Melo, R. P., Kim, P. C., Guerra, N. R., Alves, L. C., Costa, D. F., ... & Mota, R. A. (2018). Molecular and serological investigation of infectious diseases in captive and free-range crab-eating fox (*Cerdocyon thous*–Linnaeus, 1776) from northeastern Brazil. *Acta parasitologica*, 63(1), 184-189.

Alvarado-Rybak, M., Solano-Gallego, L., & Millán, J. (2016). A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. *Parasites & vectors*, 9(1), 538.

Alves, F. M., Olifiers, N., Bianchi, R. D. C., Duarte, A. C., Cotias, P. M. T., D'Andrea, P. S., ... & Jansen, A. M. (2011). Modulating variables of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* transmission in free-ranging coati (*Nasua nasua*) from the Brazilian Pantanal region. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(7), 835-841.

André, M. R., Adania, C. H., Teixeira, R. H. F., Silva, K. F., Jusi, M. M. G., Machado, S. T. Z., ... & Felipe, P. A. N. (2010a). Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. *Journal of Parasitology*, 96(5), 1007-1009.

André, M. R., Adania, C. H., Teixeira, R. H. F., Vargas, G. H., Falcade, M., Sousa, L., ... & Machado, R. Z. (2010b). Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. *Veterinary parasitology*, 173(1-2), 134-138.

André, M. R., Dumler, J. S., Herrera, H. M., Gonçalves, L. R., de Sousa, K. C., Scorpio, D. G., ... & Machado, R. Z. (2016). Assessment of a quantitative 5'nuclease real-time polymerase chain reaction using the nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase gamma subunit (nuoG) for *Bartonella* species in domiciled and stray cats in Brazil. *Journal of feline medicine and surgery*, 18(10), 783-790.

Antunes, J. M. A. de P., Demoner, L. de C., Cruvinel, T. M. de A., Kataoka, A. P., Martorelli, L. F. A., Machado, G. P., & Megid, J. (2017). Rabies Virus Exposure of Brazilian Free-ranging Wildlife from Municipalities without Clinical Cases in Humans or in Terrestrial Wildlife. *Journal of wildlife diseases*, 53(3), 662-666.

Araujo, A. G. D. J., Obregón, G. O., Sampaio, G., Monteiro, A. M. V., da Silva, L. T., Soriano, B., ... & Farias, J. F. S. (2018). Relationships between variability in precipitation, river levels, and beef cattle production in the Brazilian Pantanal. *Wetlands ecology and management*, 26(5), 829-848.

Baneth, G., Sheiner, A., Eyal, O., Hahn, S., Beauvils, J.P., Anug, Y., Talmi-Frank, D., 2013. Redescription of *Hepatozoon felis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) based on phylogenetic analysis, tissue and blood form morphology, and possible transplacental transmission. *Parasites Vectors* 102 (6), 2–10.

Bastos, C. V., & Bicalho, A. P. (2003). Sedimentoscopia em urinas caninas com características físico-químicas normais: qual o seu valor. *Clínica Veterinária*, 45, 52-56.

Bezerra, J. A. B., Oliveira, I. V. P. D. M., Yamakawa, A. C., Nilsson, M. G., Tomaz, K. L. R., Oliveira, K. D. S. D., ... & Antunes, J. M. A. D. P. (2019). Serological and molecular investigation of *Leishmania* spp. infection in cats from an area endemic for canine and human leishmaniasis in Northeast Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, (AHEAD).

Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2003). Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4172-4177.

Bordes, F., & Morand, S. (2011). The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review. *Infection ecology & epidemiology*, 1(1), 7346.

Brasil. (2006). *Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal (PNCEBT): manual técnico*. MAPA/SDA/DSA.

Brasil. (2017). Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Brasília: Ministério da Saúde, 2.

Brasil. (2014). *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. 1. ed. Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal, 122 p.

Brasil. (2019a). Projeções do Agronegócio: Brasil 2018/19 a 2028/29 projeções de longo prazo / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. Brasília : MAPA/ACE.

Brasil. (2019b). Diário Oficial da União. *Secretaria-Geral da Presidência da República / Imprensa Nacional*. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/servicos/diario-oficial-da-uniao>>. Acesso em: 6 nov. 2019.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Snuc: Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza: Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000; Decreto nº 4.340, de 22 de agosto de 2002; Decreto nº 5.746, de 5 de abril de 2006. Plano Estratégico Nacional de Áreas Protegidas: Decreto nº 5.758, de 13 de abril de 2006. Brasília: MMA, 76 p., 2011. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/images/arquivos/areas\\_protegidas/snuc/Livro%20SNUC%20PNAP.pdf](http://www.mma.gov.br/images/arquivos/areas_protegidas/snuc/Livro%20SNUC%20PNAP.pdf)>. Acesso em: 04 jul. 2018

Christin, M. S., Menard, L., Gendron, A. D., Ruby, S., Cyr, D., Marcogliese, D. J., ... & Fournier, M. (2004). Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquatic toxicology*, 67(1), 33-43.

Cliquet, F., Aubert, M., & Sagne, L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *Journal of immunological methods*, 212(1), 79-87.

Cole, J. R., Sulzer, C. R., & Pursell, A. R. (1973). Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl. Environ. Microbiol.*, 25(6), 976-980.

Concone, H. V. B. (2004). Aspectos da dieta alimentar de jaguatirica (*Leopardus pardalis*, Felidae) em um ambiente antropizado no Pantanal de Miranda (Mato Grosso do Sul). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande – MS.

Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., ... & Ko, A. I. (2015). Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(9), e0003898.

Cox, F. E. G. (2001). Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* 122, S23–S38

Criado-Fornelio, A., Ruas, J. L., Casado, N., Farias, N. R., Soares, M. P., Müller, G., ... & Barba-Carretero, J. C. (2006). New molecular data on mammalian Hepatozoon species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *Journal of Parasitology*, 92(1), 93-100.

da SILVA, F. J., dos SANTOS, C. E. P., Silva, T. R., Silva, G. C. P., Loffler, S. G., Brihuega, B., ... & Mathias, L. A. (2015). Pesquisa de leptospirosas e de anticorpos contra leptospirosas em animais e humanos de propriedades rurais nos biomas brasileiros Pantanal e Caatinga. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 52(3), 234-248.

Dantas-Torres, F. (2009). Canine leishmaniosis in south america. *Parasites & Vectors*, 2(1), S1.

de Carvalho Dores, E. F. G. (2015). Pesticides in the Pantanal. In *Dynamics of the Pantanal Wetland in South America* (pp. 179-190). Springer, Cham.

de Quadros, R. M., Soares, J. F., Xavier, J. S., Pilati, C., da Costa, J. L., Miotto, B. A., ... & Labruna, M. B. (2015). Natural infection of the wild canid *Lycalopex gymnocercus* by the protozoan *Rangelia vitalii*, the agent of canine rangeliellosis. *Journal of wildlife diseases*, 51(3), 787-789.

de Sousa, K. C. M., Calchi, A. C., Herrera, H. M., Dumler, J. S., Barros-Battesti, D. M., Machado, R. Z., & Andre, M. R. (2017a). Anaplasmataceae agents among wild mammals and ectoparasites in Brazil. *Epidemiology & Infection*, 145(16), 3424-3437.

- de Sousa, K. C. M., Fernandes, M. P., Herrera, H. M., Benevenuto, J. L., Santos, F. M., Rocha, F. L., ... & de Andrade Pinto, P. C. E. (2017b). Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. *Veterinary parasitology*, 237, 37-46.
- de Sousa, K. C. M., Herrera, H. M., Secato, C. T., do Vale Oliveira, A., Santos, F. M., Rocha, F. L., ... & Costa, M. T. (2017c). Occurrence and molecular characterization of hemoplasmas in domestic dogs and wild mammals in a Brazilian wetland. *Acta tropica*, 171, 172-181.
- de Sousa, K. C. M., Fernandes, M. P., Herrera, H. M., Freschi, C. R., Machado, R. Z., & André, M. R. (2018). Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, 9(2), 245-253.
- de Souza, V. K., Dall'Agnol, B., Souza, U. A., Webster, A., Peters, F. B., Favarini, M. O., ... & de Assis Jardim, M. M. (2019). Detection of *Rangelia vitalii* (Piroplasmida: Babesiidae) in asymptomatic free-ranging wild canids from the Pampa biome, Brazil. *Parasitology research*, 118(4), 1337-1342.
- Dobson, A., & Foufopoulos, J. (2001). Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 356(1411), 1001-1012.
- Doyle, C.K., Labruna, M.B., Breitschwerdt, E.B., Tang, Y.W., Corstvet, R.E., Hegarty, B.C., Bloch, K.C., Li, P., Walker, D.H., McBride, J.W. (2005). Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the dsb gene. *J. Mol. Diagn.* 7 (4), 504–510.
- East, M. L., Wibbelt, G., Lieckfeldt, D., Ludwig, A., Goller, K., Wilhelm, K., ... & Hofer, H. (2008). A *Hepatozoon* species genetically distinct from *H. canis* infecting spotted hyenas in the Serengeti ecosystem, Tanzania. *Journal of wildlife diseases*, 44(1), 45-52.
- Ellis, W.A. (2015). Animal Leptospirosis. In: Adler, B. *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer, Berlin, Heidelberg*, 99-137.
- Fajriyah, S. N., Udiyono, A., & Saraswati, L. D. (2017). Environmental and risk factors of leptospirosis: a spatial analysis in Semarang City. *IOP Publishing Conference Series: Earth and Environmental Science*, 55(1).
- Fornazari, F., Langoni, H., Marson, P. M., Nóbrega, D. B., & Teixeira, C. R. (2018). Leptospira reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents. *Acta tropica*, 178, 205-212.
- Forterre, S., Raila, J., & Schweigert, F. J. (2004). Protein profiling of urine from dogs with renal disease using ProteinChip analysis. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 16(4), 271-277.
- Frankel, V. M., Hendry, A. P., Rolshausen, G., & Torchin, M. E. (2015). Host preference of an introduced 'generalist' parasite for a non-native host. *International journal for parasitology*, 45(11), 703-709.
- Fredo, G., Bianchi, M. V., De Andrade, C. P., De Souza, S. O., Leite-Filho, R. V., Bandinelli, M. B., ... & Sonne, L. (2015). Natural infection of wild canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the intraendothelial piroplasm *Rangelia vitalii* in Southern Brazil. *Journal of wildlife diseases*, 51(4), 880-884.
- Frontera-Acevedo, K., Balsone, N. M., Dugan, M. A., Makemson, C. R., Sellers, L. B., Brown, H. M., ... & Sakamoto, K. (2013). Systemic immune responses in *Cytauxzoon felis*-infected domestic cats. *American journal of veterinary research*, 74(6), 901-909.
- Funk, S. M., Fiorello, C. V., Cleaveland, S., Goompper, M.E. (2001). The role of disease in carnivore ecology and conservation. In: Gittleman, J.L., Funk S.M., MacDonald D.W., WAYNE R.K. *Carnivore Conservation*. University Press, Cambridge.
- Galton, M. M., Sulzer, C. R., Santa Rosa, C. A., & Fields, M. J. (1965). Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 13(1), 81-85.
- Garcia-Navarro, C. E. K. (1996). Manual de urinálise veterinária. *São Paulo: Varela*, 95.
- Gomes, M. S. (2007). Canídeos brasileiros (loboguará, cachorro-do-mato, raposa-do-campo). In: Cubas, Z. S., Silva, J. C. R. & Catão-Dias, J. L. *Tratado de animais selvagens. São Paulo: Roca*, 492-504.
- Gottlieb, J., André, M. R., Soares, J. F., Gonçalves, L. R., Tonal de Oliveira, M., Costa, M. M., ... & Vieira, M. I. B. (2016). *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. em cães de Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25(2), 172-178.
- Graham, A. L. (2008). Ecological rules governing helminth–microparasite coinfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(2), 566-570.

- Greene C.E., Sykes J.E., Brown C.A. & Hartmann K. (2006). Leptospirosis. In: Greene C.E. Infectious Diseases of the Dog and Cat. *Saunders Elsevier*, 402-417.
- Guedes, P. M., Veloso, V. M., Caliani, M. V., Carneiro, C. M., Souza, S. M., Lana, M. D., ... & Galvão, L. (2007). *Trypanosoma cruzi* high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagledogs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(2), 141-147.
- Halliday, J. E., Meredith, A. L., Knobel, D. L., Shaw, D. J., Bronsvoort, B. M. D. C., & Cleaveland, S. (2007). A framework for evaluating animals as sentinels for infectious disease surveillance. *Journal of the Royal Society Interface*, 4(16), 973-984.
- Hendrix, C. M. (2005). Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários. *Editores Roca*.
- Herrera, H. M., Rocha, F. L., Lisboa, C. V., Rademaker, V., Mourão, G. M., & Jansen, A. M. (2011). Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(7), 380-387.
- Inokuma, H., Raoult, D., & Brouqui, P. (2000). Detection of Ehrlichia platys DNA in brown dog ticks (Rhipicephalus sanguineus) in Okinawa Island, Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 4219-4221.
- Jansen, A. M., das Chagas Xavier, S. C., & Roque, A. L. R. (2018). *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites & vectors*, 11(1), 502.
- Jefferies, R., Ryan, U. M., & Irwin, P. J. (2007). PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Veterinary parasitology*, 144(1-2), 20-27.
- Jennelle, C. S., Cooch, E. G., Conroy, M. J., & Senar, J. C. (2007). State-specific detection probabilities and disease prevalence. *Ecological Applications*, 17(1), 154-167.
- Jorge, R. S. P., Rocha, F. L., May Júnior, J. A., & Morato, R. G. (2010). Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública.
- Junqueira, J. R., & Alfieri, A. A. (2006). Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semina: Ciências Agrárias*, 27(2), 289-298.
- Killick-Kendrick, R., Lumsden, W. H. R., & Evans, D. A. (1979). Biology of the Kinetoplastida. *Academic Press, The University of Michigan, New York*. pp, 738.
- Kubo, M., Miyoshi, N., Yasuda, N. (2006). Hepatozoonosis in two species of Japanese wild cat. *J. Vet. Med. Sci.* 833-837
- Langston, C. E., & Heuter, K. J. (2003). Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 33(4), 791-807.
- Lemos, T. D., Cerqueira, A. D. M. F., Toma, H. K., Silva, A. V. D., Corrêa, R. G. B., Paludo, G. R., ... & Almosny, N. R. P. (2012). Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(2), 137-142.
- Lilenbaum, W., Monteiro, R. V., Albuquerque, C. E., Ristow, P., Fraguas, S., Cardoso, V. S., & Fedullo, L. P. L. (2004). Leptospiral antibodies in wild felines from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *Veterinary journal*.
- Lindfors, P., Nunn, C. L., Jones, K. E., Cunningham, A. A., Sechrest, W., & Gittleman, J. L. (2007). Parasite species richness in carnivores: effects of host body mass, latitude, geographical range and population density. *Global Ecology and Biogeography*, 16(4), 496-509.
- Loker, E., & Hofkin, B. (2015). *Parasitology: a conceptual approach*. Garland Science.
- Lourenço, M. L. G., Takahira, R. K., Machado, L. H. A., Moutinho, F. Q., Ferreira, H., Balieiro, J. C. C., ... & Fontque, J. H. (2012). Monitoramento de parâmetros laboratoriais em gatos sem raça definida durante o período neonatal. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 25-31.
- Machado, R. Z., Montassier, H. J., Pinto, A. A., Lemos, E. G., Machado, M. R. F., Valadão, I. F. F., ... & Malheiros, E. B. (1997). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against Babesia bovis in cattle. *Veterinary Parasitology*, 71(1), 17-26.
- Maggi, R. G., Chitwood, M. C., Kennedy-Stoskopf, S., & DePerno, C. S. (2013). Novel hemotropic Mycoplasma species in white-tailed deer (Odocoileus virginianus). *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 36(6), 607-611.

Malheiros, J., Costa, M. M., Do Amaral, R. B., de Sousa, K. C. M., André, M. R., Machado, R. Z., & Vieira, M. I. B. (2016). Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(5), 893-900.

Masiga, D.K., Smyth, A.J., Hayes, P., Bromidge, T.J., Gibson, W.C. (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Parasitol.* 22, 909–918.

Massung, R. F., Slater, K., Owens, J. H., Nicholson, W. L., Mather, T. N., Solberg, V. B., & Olson, J. G. (1998). Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), 1090-1095.

Matos, H. J. D., Pinto, A. Y. D. N., Miranda, A. M. M., Silva, F. L. C., & Ramos, F. L. D. P. (2015). Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 6(1), 65-68.

Mattoso, C. R., Catenacci, L. S., Beier, S. L., Lopes, R. S., & Takahira, R. K. (2012). Hematologic, serum biochemistry and urinary values for captive Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) in São Paulo state, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(6), 559-566.

May-Júnior, J. A., Songsasen, N., Azevedo, F. C., Santos, J. P., Paula, R. C., Rodrigues, F. H. G., ... & Morato, R. G. (2009). Hematology and blood chemistry parameters differ in free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) living in the Serra da Canastra National Park versus adjacent farmlands, Brazil. *Journal of wildlife diseases*, 45(1), 81-90.

Metzger, B., dos Santos Paduan, K., Rubini, A. S., de Oliveira, T. G., Pereira, C., & O'dwyer, L. H. (2008). The first report of Hepatozoon sp.(Apicomplexa: Hepatozoidae) in neotropical felids from Brazil. *Veterinary parasitology*, 152(1-2), 28-33.

Millán, J., García, E. J., Oleaga, Á., López-Bao, J. V., Llana, L., Palacios, V., ... & León-Vizcaíno, L. (2014). Using a top predator as a sentinel for environmental contamination with pathogenic bacteria: the Iberian wolf and leptospires. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(8), 1041-1044.

Miyazawa T, Jarrett O. Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non- viraemic ('discordant') cats. *Arch Virol* 1997;142:323–332.

Mohr, C.O. & Stumpf, W.A. (1964) Relation of tick and chigger infestations to home areas of California meadow mice. *Journal of Medical Entomology*, 1, 73–77

Moore, S. M., & Hanlon, C. A. (2010). Rabies-specific antibodies: measuring surrogates of protection against a fatal disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(3), e595.

Moreira, R. H., Ribeiro, T. B., Trentin, T. D. C., & Sacco, S. R. (2009). Hiperadrenocorticism iatrogênico em cão: relato de caso. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, (13).

Mundim, A. V., de Moraes, I. A., Tavares, M., Cury, M. C., & Mundim, M. J. S. (2008). Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by Hepatozoon sp. and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 153(1-2), 3-8.

Noyes, H. A., Stevens, J. R., Teixeira, M. M. G. T., Phelan, J., & Holz, P. (1999). A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. *International Journal for Parasitology*, 29(2), 331-339.

Olifiers, N., de Cassia Bianchi, R., D'Andrea, P. S., Mourao, G., & Gompper, M. E. (2010). Estimating age of carnivores from the Pantanal region of Brazil. *Wildlife Biology*, 16(4), 389-400.

Olifiers, N., Jansen, A. M., Herrera, H. M., de Cassia Bianchi, R., D'Andrea, P. S., de Miranda Mourão, G., & Gompper, M. E. (2015). Co-infection and wild animal health: effects of trypanosomatids and gastrointestinal parasites on coatis of the Brazilian Pantanal. *PLoS One*, 10(12), e0143997.

Pedersen, A. B., & Fenton, A. (2007). Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends in ecology & evolution*, 22(3), 133-139.

Pennisi, M. G., & Persichetti, M. F. (2018). Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog?. *Veterinary parasitology*, 251, 131-137.

Pennisi, M. G., Lupo, T., Malara, D., Masucci, M., Migliazzo, A., & Lombardo, G. (2012). Serological and molecular prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from Southern Italy. *J Feline Med Surg*, 14(656), 7.

- Perkins, S. L., & Keller, A. K. (2001). Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. *Journal of Parasitology*, 87(4), 870-877.
- Pignati, W. A., & Calheiros, D. F. (2018). O modelo de (des) envolvimento agrícola em Mato Grosso e os impactos dos agrotóxicos na saúde ambiental e humana. *Poluição*, 165.
- Raghavan, R. K., Almes, K., Goodin, D. G., Harrington Jr, J. A., & Stackhouse Jr, P. W. (2014). Spatially heterogeneous land cover/land use and climatic risk factors of tick-borne feline cytauxzoonosis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(7), 486-495.
- Rangel, D. A., Lisboa, C. V., Novaes, R. L. M., Silva, B. A., de Franca Souza, R., Jansen, A. M., ... & Roque, A. L. R. (2019). Isolation and characterization of trypanosomatids, including *Crithidia mellificae*, in bats from the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(7).
- Rocha, F. L., Roque, A. L. R., de Lima, J. S., Cheida, C. C., Lemos, F. G., de Azevedo, F. C., ... & Jansen, A. M. (2013). *Trypanosoma cruzi* infection in neotropical wild carnivores (Mammalia: Carnivora): at the top of the *T. cruzi* transmission chain. *Plos one*, 8(7), e67463.
- Rodrigues, M. S., Lima, L., das Chagas Xavier, S. C., Herrera, H. M., Rocha, F. L., Roque, A. L. R., ... & Jansen, A. M. (2019). Uncovering *Trypanosoma* spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 8, 171-181.
- Roque, A. L. R., Xavier, S. C., da Rocha, M. G., Duarte, A. C. M., D'Andrea, P. S., & Jansen, A. M. (2008). *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 79(5), 742-749.
- Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), 251-262.
- Sano, E. E., Rosa, R., Brito, J. L., & Ferreira, L. G. (2010). Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environmental monitoring and assessment*, 166(1-4), 113-124.
- Santos, F. M., Barreto, W. T. G., de Macedo, G. C., da Silva Barros, J. H., das Chagas Xavier, S. C., Garcia, C. M., ... & de Andrade, G. B. (2019). The reservoir system for *Trypanosoma* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) species in large neotropical wetland. *Acta tropica*, 199, 105098.
- Santos, F. M., de Macedo, G. C., Barreto, W. T. G., Oliveira-Santos, L. G. R., Garcia, C. M., de Miranda Mourao, G., ... & de Oliveira, C. E. (2018). Outcomes of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* infections on health of Southern coati (*Nasua nasua*), crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), and ocelot (*Leopardus pardalis*) in the Brazilian Pantanal. *PloS one*, 13(8), e0201357.
- Scott, M. E. (1988). The impact of infection and disease on animal populations: implications for conservation biology. *Conservation biology*, 2(1), 40-56.
- Serrano, E., & Millán, J. (2014). What is the price of neglecting parasite groups when assessing the cost of co-infection?. *Epidemiology & Infection*, 142(7), 1533-1540.
- Sikes, R. S., & Gannon, W. L. (2011). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of mammalogy*, 92(1), 235-253.
- Silva, B. R. D., Ferreira, M. D. F. K., Maffezzolli, G., Koch, M. D. O., Beltrame, O. C., Taques, I. I. G. G., ... & Dittrich, R. L. (2019). Detection molecular of *Rangelia vitalii* in dogs from Parana State, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28(2), 310-313.
- Silva, J. D. S. V., & Abdon, M. D. M. (1998). Delimitação do pantanal brasileiro e suas sub-regiões. *Área de Informação da Sede-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Silva, M. P. D., Mauro, R., Mourao, G., & Coutinho, M. (2000). Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. *Revista brasileira de Botânica*, 23(2), 143-152.
- Silveira, J. A. G., D'Elia, M. L., de Oliveira Avelar, I., de Almeida, L. R., dos Santos, H. A., de Magalhaes Soares, D. F., ... & Ecco, R. (2016). *Rangelia vitalii* in a free-ranging maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and co-infections. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(3), 280-285.
- Soares, J. F., Carvalho, L., Maya, L., Dutra, F., Venzal, J. M., & Labruna, M. B. (2015). Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. *Veterinary parasitology*, 210(1-2), 98-101.

Soares, J. F., Giroto, A., Brandão, P. E., Da Silva, A. S., França, R. T., Lopes, S. T., & Labruna, M. B. (2011). Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 180(3-4), 203-208.

Soriano, B. M. A. (1996). Caracterização climática da sub-região da Nhecolândia, Pantanal-MS. *Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal*, 2.

Souto, R. P., & Zingales, B. (1993). Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62(1), 45-52.

Taylor, L. H., Latham, S. M., & Woolhouse, M. E. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 356(1411), 983-989.

Telfer, S., Lambin, X., Birtles, R., Beldomenico, P., Burthe, S., Paterson, S., & Begon, M. (2010). Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science*, 330(6001), 243-246.

Teribele, R. (2007). Comparações entre taxas de encontro de mamíferos de médio e grande porte em focagens noturnas, em dois períodos sazonais, na Fazenda San Francisco (Pantanal, Miranda-Mato Grosso do Sul).

Tolentino, N., Pinheiro, G. R. G., Ottino, J., de Oliveira, A. R., Coelho, C. M., Tinoco, H. P., ... & Ribeiro, V. M. (2019). Serological evidence of Leishmania infection by employing ELISA and rapid tests in captive felids and canids in Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 17, 100308.

Troyer, J.L., Pecon-Slatery, J., Roelke, M.E., Johnson, W., Van- deWoude, S., Va'zquez-Salat, N., Brown, M., Frank, L., Woodr- offe, R., Winterbach, C., Winterbach, H., Hemson, G., Bush, M., Alexander, K.A., Revilla, E., O'Brien, S.J., 2005. Seroprevalence and genomic divergence of circulating strains of feline immunodeficiency virus among Felidae and Hyaenidae species. *Journal of Virology* 79, 8282–8294.

Ujvari, B., Madsen, T., & Olsson, M. (2004). High prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from tropical Australia. *Journal of parasitology*, 90(3), 670-673.

Valantin-Morison, M., Sarthou, J. P., de Tourdonnet, S., Gosme, M., Bertrand, M., Roger-Estrade, J., ... & Doré, T. (2011). Agroecosystem management and biotic interactions: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 3 (31), 491–514.(2011).

Viana, F.A.B. (2003). Guia terapêutico veterinário. *Lagoa Santa: Cem*, 324.

Vieira, A. S., Narduche, L., Martins, G., Péres, I. A. S., Zimmermann, N. P., Juliano, R. S., ... & Lilenbaum, W. (2016). Detection of wild animals as carriers of *Leptospira* by PCR in the Pantanal biome, Brazil. *Acta tropica*, 163, 87-89.

VSF International. (2014). Agroecology and One Health. Building a Solid and Lasting One Health on the Basis of Agroecology. *Animal Health & One Health, Policy paper*.

WHO, World Health Organization (2005). WHO Expert Consultation of Rabies. Technical Report Series 931. 1st report.

Widmer, C. E., Matushima, E. R., & de Azevedo, F. C. C. (2016). Clinical Evaluation, Hematology, and Serum Chemistry of Ocelots (*Leopardus pardalis*) in the Atlantic Forest of Brazil. *Journal of wildlife diseases*, 52(4), 916-921.

Willi, B., Boretti, F. S., Baumgartner, C., Tasker, S., Wenger, B., Cattori, V., ... & Hofmann-Lehmann, R. (2006). Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 961-969.

Zhang, S., Liu, Y., Fooks, A. R., Zhang, F., & Hu, R. (2008). Oral vaccination of dogs (*Canis familiaris*) with baits containing the recombinant rabies-canine adenovirus type-2 vaccine confers long-lasting immunity against rabies. *Vaccine*, 26(3), 345-350.

## Capítulo 2

### Alta prevalência de *Leptospira* spp. em *Leopardus pardalis* e *Cerdocyon thous* (Carnivora) silvestres em área de agroecossistema no Pantanal de Miranda, Mato Grosso do Sul, Brasil

Manuscrito a ser submetido para Revista Acta tropica

#### Resumo

A *Leptospira* spp. é uma bactéria de ampla distribuição geográfica, capaz de acometer o ser humano e grande variedade de animais. Dessa forma, possui importância na saúde pública, dada sua alta morbimortalidade, no ciclo produtivo ao afetar também animais de pecuária, além de importância na saúde da fauna silvestre. Animais da Ordem Carnivora desempenham papel particular no ciclo da *Leptospira* spp. dada as suas amplas áreas de vida e potencial de eliminar a bactéria pela urina e assim contaminar o ambiente. A persistência da bactéria no meio é favorecida em ambientes alagados, seja em paisagem natural ou modificada. Pouco se sabe, contudo, da ocorrência do parasito em áreas de agroecossistema no Brasil. Neste trabalho, capturamos 13 jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) e 12 cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) em um mosaico de lavouras de arroz e pastagem inserido em matriz de área nativa no Pantanal de Miranda, Brasil. Investigamos a ocorrência da bactéria por diagnóstico sorológico (n=25), molecular em amostras de sangue (n=25) e urina (n=5) e isolamento bacteriológico em amostras de urina (n=5). Apresentamos altas taxas de soroprevalência (17/25; 68%) e altos valores de títulos (até 6400) e indicamos a ocorrência de um ciclo ativo da bactéria na região. Detectamos 17 sorovares, sendo o primeiro relato de Cynopteri, Butembo e Bataviae em carnívoros de vida livre no Brasil, e de Autumnalis e Copenhageni em jaguatiricas. Pomona e Bratislava foram os sorovares infectantes de maior ocorrência em jaguatiricas e cachorros-do-mato, respectivamente. Esse resultado sugere ciclos independentes entre as espécies, mas indica sobreposição com o ciclo bovino da região. A influência da fauna silvestre sobre o gado reflete a necessidade de ampliação do painel de sorovares investigados no rebanho. Os resultados também apontam para a importância do uso de equipamentos de proteção individual como medida profilática especialmente entre os funcionários das lavouras de arroz.

**Palavras-chave:** Saúde Única, epidemiologia, sorologia, arroz irrigado.

#### 1. Introdução

*Leptospira* spp. é uma bactéria de ampla distribuição geográfica com grande potencial zoonótico, cuja principal via de transmissão é o contato com água contaminada, especialmente por pele lesionada e mucosas (Levett 2001). A leptospirose é considerada uma das principais causas de morbimortalidade em humanos, com cerca de um milhão de casos e 58.900 óbitos por ano em todo o mundo (Costa et al. 2015). Amplamente disseminada na América Latina (Vieira et al. 2018), no Brasil mais de 42 mil casos da doença foram notificados entre 2000 e 2017 (SINAN 2019). Além da importância para saúde pública, a *Leptospira* é relevante para a economia por resultar em abortos e natimortos em animais de produção (Ellis 2015), acometendo cerca de 44,2% dos bovinos na América Latina (Junqueira e Alfieri 2006; da Silva Pinto et al. 2016; Guedes et al. 2019).

No ambiente silvestre, a *Leptospira* spp. pode acometer aves, répteis, anfíbios e mamíferos, tornando difícil a compreensão de seu complexo ciclo epidemiológico (Viera et al. 2018). A contaminação do ambiente ocorre a partir da eliminação da bactéria pela urina de animais infectados. Uma vez no ambiente, a sobrevivência das bactérias varia com as condições climáticas da região, sendo áreas alagadas consideradas ideais para sua persistência (Acha e Szyfres 2003; Jorge et al. 2011; Fajriyah et al. 2017; Vieira et al. 2018).

Entre os mamíferos, carnívoros podem ter importância para a persistência da bactéria no meio ambiente pelo potencial de eliminá-la por via urinária (da Silva et al. 2015; Vieira et al. 2016; Fornazari et al. 2018). Além disso, possuem extensas áreas de vida (Cheida et al. 2011, Millán et al. 2014), favorecendo a disseminação do parasito em ambientes distintos. É importante considerar que carnívoros silvestres podem desenvolver a doença resultante da infecção por *Leptospira* spp. até mesmo de forma fatal (Lilenbaum et al. 2004; Vieira et al. 2016).

Caracterizado por ser a maior planície alagável do mundo, o Pantanal possui rica biodiversidade e apresenta a pecuária como principal atividade econômica (Silva e Abdon 1998; Araújo et al. 2018). As inundações periódicas, além de modificar a paisagem drasticamente, aproximam as populações de animais silvestres e domésticos resultando em ambiente propício para a ocorrência de doenças carregadas pela água, como a leptospirose. De fato, a ocorrência da infecção por *Leptospira* spp. em animais silvestres e domésticos na região do Pantanal já foi reportada por vários autores (Jorge et al. 2011; Vieira et al. 2013; Onuma et al. 2015; Miashiro et al. 2018). Além disso, a leptospirose é uma doença considerada de caráter ocupacional em humanos comumente relacionada a trabalhadores de lavouras de arroz (Schneider et al. 2015; Amaral 2016; Sahneh et al. 2019). Esse cultivo, no Pantanal, favorece ainda mais a persistência e a transmissão da *Leptospira* spp. (Khan et al. 2017) e pode ter um importante papel na epidemiologia da doença em humanos.

Dessa forma, uma área destinada ao cultivo de arroz e pecuária inserida em matriz de Pantanal preservado, com frequentes avistamentos de animais silvestres, especialmente roedores, mostra-se interessante para a investigação de *Leptospira* spp. e entendimento da enzootia, como é o caso de uma região localizada em ecótono de Pantanal e Cerrado, no Pantanal de Miranda, Brasil (Concone 2004; Teribele 2007). É possível que roedores e outros herbívoros sejam atraídos pela oferta alimentar e hídrica provida pelo cultivo de arroz. Para controle da *Leptospira* spp., a investigação dos sorovares circulantes é uma importante ferramenta. Devido às características ecológicas de carnívoros, neste trabalho esses animais foram eleitos para a construção do panorama de sorovares na região. Assim, investigamos a frequência da *Leptospira* em carnívoros silvestres por meio de testes sorológico, molecular e isolamento bacteriológico. Ainda, apresentamos as frequências dos principais sorovares circulando nas espécies estudadas e discutimos as perspectivas desses resultados sob a ótica da Saúde Única.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Área de estudo**

A pesquisa foi realizada em uma fazenda privada (20°05'10" S e 56°36'57" W) no Pantanal de Miranda, estado Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Devido ao regime pluviométrico característico de Pantanal, a área apresenta duas estações, uma seca, entre abril e setembro, e uma chuvosa, entre outubro e março. A fazenda apresenta precipitação média de 1.520 mm/ano e temperatura variando entre 3°C em julho e agosto até 46°C em janeiro (*comunicação pessoal*). A propriedade possui 8.970 ha inseridos em matriz de vegetação nativa de fitofisionomias predominantes de cerradão, cerrado, mata semidecídua e campo seco (Silva et al. 2000), dos quais 3.200 ha foram convertidos para cultivo intensamente manejado de arroz irrigado, com diques e canais

de irrigação totalizando 13 km de extensão (Fig. 1), alternado com culturas de soja e milho; 2.100 ha para pecuária, com criação de mais de 2.000 cabeças de gado, e 70 ha para cultivo de eucalipto (Fig. 2). Outra atividade importante na fazenda é o ecoturismo, com fluxo de cerca de 5.000 pessoas por ano e avistamento principalmente de animais das ordens Carnivora, Rodentia e Artiodactyla (Teribele 2007), além de diversas espécies de aves (Concone 2004).

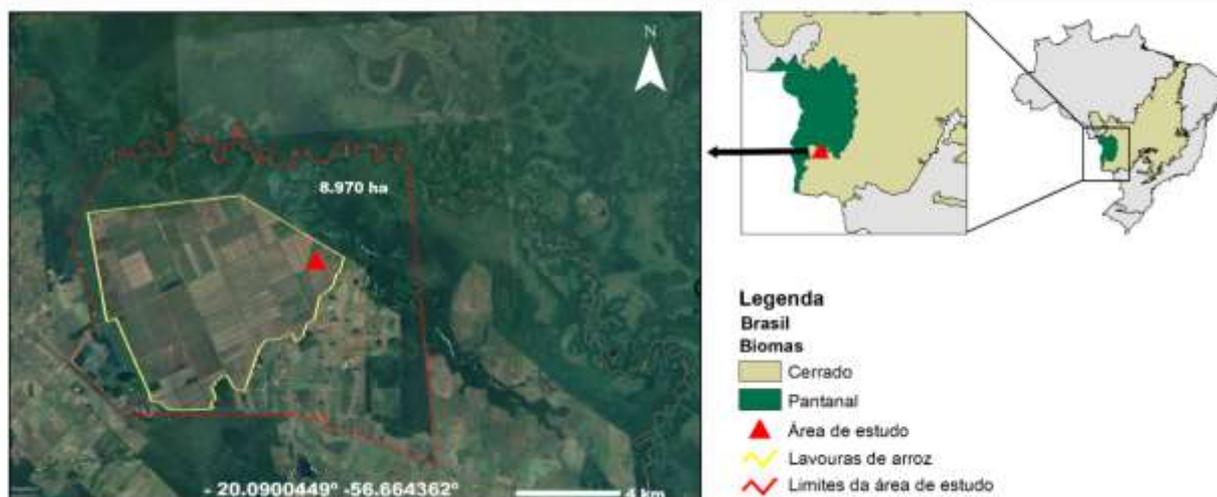


Figura 2: Área de estudo de investigação de *Leptospira* spp. em carnívoros silvestres no Pantanal de Miranda, Brasil. As cores indicam os limites da fazenda e a área destinada a lavouras de arroz, conforme legenda.

## 2.2 Amostragem

Visando a captura de carnívoros de médio porte, utilizamos armadilhas do tipo caixa armada de ferro (150x60x60cm e 115x53x58cm) iscadas com coxa de frango, bacon aquecido e/ou sardinha enlatada, distribuídas aleatoriamente nos diferentes habitats da área de estudo. Entre agosto e dezembro de 2018, com o total de 541 armadilhas-noite, capturamos 25 indivíduos, entre jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) e cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*). Classificamos os animais por faixa etária a partir de erupção e desgaste dentários, porte e peso, conforme Olifiers et al. 2010.

Os indivíduos foram anestesiados com Zoletil 50® (8 mg/kg) ou com associação de quetamina 15mg/kg, xilazina 0,7mg/kg e midazolam 0,5mg/kg, todos por via intramuscular. Coletamos amostras de sangue em tubos com e sem anticoagulante das veias cefálica ou jugular de todos os animais, e amostras de urina com sonda uretral de cachorros-do-mato machos, adultos e juvenis (n=5). Todos os animais foram marcados com brincos de identificação. Para obtenção de soro, realizamos centrifugação do sangue sem anticoagulante a 1.300 xg por 15 minutos. Alíquotas de 500 µl de soro, sangue total e urina foram congeladas a -20°C até realização dos ensaios laboratoriais. Seis mililitros de urina foram destinados à urocultura.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso Animal da Universidade Federal da Paraíba (7478200418 – ID 000109). A captura e coleta de amostras foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade – ICMBio/SISBIO (Nº 31895), conforme legislação brasileira. Todas as capturas foram conduzidas por médica veterinária devidamente registrada e seguiram as recomendações do Guia da Sociedade Americana de Mamíferos (Sikes 2011).



Figura 2: Ambientes da área de estudo e possíveis pontos de conexão de elementos dos ciclos de transmissão de *Lepstopira* spp. em área de agroecossistema no Pantanal de Miranda, Brasil. A) Lavoura de arroz; B) Área de pecuária adjacente a fragmento florestal; C) Área de vegetação nativa; D) Liberação de *Leopardus pardalis* capturado em lavoura; E) *Cerdocyon thous* em floresta de eucalipto; F) Funcionário da lavoura sem utilização de equipamentos de proteção individual.

### 2.3 Análises laboratoriais

Os ensaios laboratoriais foram realizados no Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB) da Universidade de São Paulo. Realizamos teste de soroglutinação microscópica (SAM) de acordo com Faine et al. (1999), com antígenos vivos de amostras de referência ou autóctones isoladas no Brasil, pertencentes aos sorogrupos (sorovares): Australis (sorovares: Australis e Bratislava); Autumnalis (sorovares: Autumnalis e

Butembo); Ballum (sorovar: Castellonis); Batavia (sorovar: Bataviae) Canicola (sorovar: Canicola); Celledoni (sorovar: Whitcombi); Cynopteri (sorovar: Cynopteri); Grippytyphosa (sorovar: Grippytyphosa); Hebdomadis (sorovar: Hebdomadis); Icterohaemorrhagiae (sorovares: Copenhageni e Icterohaemorrhagiae); Javanica (sorovar: Javanica); Panama (sorovar: Panama); Pomona (sorovar: Pomona-CDC, Pomona-GR6 e *L. kirschneri*); Pyrogenes (sorovar: Pyrogenes); Sejroe (sorovar: Guaricura e Hardjo tipo prajitno e bovis); Shermani (sorovar: Shermani); Tarassovi (sorovar: Tarassovi); Djasiman (sorovar: Sentot); Seramanga (sorovar: Patoc); Grippytyphosa (sorovar: Bananal); *L. biflexa* (Bovedo); *L. biflexa* (Garcia); *L. biflexa* (Nazaré); *L. santarosai*; Mini (sorovar: Mini); *L. biflexa* (Rufino). Ressaltamos que a variedade *L. kirschneri* foi isolada em 2006 de um indivíduo de *C. thous*, sendo incluída no painel de sorovares visando aumentar a sensibilidade do teste. Apesar de não caracterizada, possivelmente é pertencente ao sorogrupo Pomona (LZB, *comunicação pessoal*). Incluímos no mesmo sorogrupo a variedade Pomona-GR6, também isolada no Brasil (Miraglia et al. 2015), totalizando 34 sorovares investigados. Excetuando-se o sorovar Sentot e a *L. biflexa*, todas as variedades testadas são consideradas patogênicas para mamíferos (Bharti et al. 2003).

Para tanto, diluímos o soro em solução salina de Sørensen (pH 7,4) na proporção de 1:50. Da diluição obtida, depositamos 50µl em microplacas de poliestireno com 96 poços e, então, adicionamos 50µl do antígeno, alcançando a diluição 1:100 (ponto de corte). As placas eram então mantidas à temperatura ambiente (~28°C) por duas horas para a leitura por microscopia de campo escuro. Como forma de controle do teste, analisamos viabilidade, pureza e autoaglutinação de cada antígeno microscopicamente. Consideramos reagentes as amostras que apresentaram pelo menos 50% de leptospiros aglutinadas nessa diluição. Para obtenção do título final de aglutinação (T), testamos as amostras reagentes a partir de diluição seriada na razão dois em solução salina de Sørensen (pH 7,4) acrescida de 50µl do antígeno reagente. Após seguir mesmo tempo e temperatura até a leitura, definimos o valor de T pela maior diluição para a qual a amostra foi reagente.

Adicionalmente, realizamos diagnóstico molecular para o parasito por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para tanto, extraímos DNA de amostras de sangue total e de urina por meio dos kits QIAGEN® e INVITROGEN®, respectivamente, seguindo as recomendações dos fabricantes. Em seguida, realizamos PCR para fragmento de 330pb do gene 16S rRNA (*rrs*), como forma de triagem, a partir dos primers Lep1 e Lep2, segundo o protocolo de Mérien et al. (1992). Para amplificação do DNA para *Leptospira* spp., utilizamos Go Taq™ Green Master Mix (Promega Brasil®), conforme instruções dos fabricantes. Cultura de *L. interrogans* sorovar Hardjo tipo prajitno foi usada como controle positivo, e água ultrapura, como controle negativo. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1.5% corado com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta.

Para cultura bacteriológica, processamos a urina em até duas horas após a coleta. Para tanto, semeamos a amostra em duplicata (3 mL da amostra cada) em meio EMJH (Ellighausen, McCulloch, Johnson e Harris) enriquecido com soro de coelho 10% adicionado do antibiótico 5-fluorouracil. Após 24 horas mantidos à temperatura ambiente (entre 28°C e 36°C) e protegidos de luz solar, transferimos o conteúdo para o meio Fletcher sem antibiótico, sendo os tubos acondicionados da mesma forma. Após 16 a 24 semanas de incubação, no LZB, avaliamos os cultivos sob microscopia de campo escuro. Amostras com ausência de *Leptospira* foram consideradas negativas.

## 2.4 Análises estatísticas

Investigamos diferença na soroprevalência de *Leptospira* entre as espécies pelo Teste de Fischer (nível de significância  $\alpha = 0,05$ ). Consideramos como sorovar infectante por indivíduo o que apresentou maior título, sendo incluídas todas as variantes com esse T quando o valor era repetido, conforme realizado por Fornazari et al. (2018). Avaliamos a distribuição de todos os sorovares detectados por espécie graficamente.

## 3. Resultados

Capturamos 13 jaguatiricas, todas em áreas de lavoura de arroz, e 12 cachorros-do-mato, em áreas de pecuária, eucalipto, arroz e fragmento florestal (Fig. 2). Dos 25 animais amostrados, 17 foram reagentes na SAM para pelo menos um dos sorovares testados (Tab. 1). A frequência de animais positivos entre as jaguatiricas foi de 69% (9/13), com títulos variando de 400 a 6.400. Para os cachorros-do-mato, a frequência foi de 66% (8/12) com títulos (T) variando de 200 a 6.400. Não houve diferença significativa na frequência de animais soropositivos entre as espécies. Uma jaguatirica foi amostrada duas vezes em intervalo de um mês, e suas alíquotas de soro e sangue foram submetidas aos mesmos protocolos. Esse animal foi soronegativo na primeira captura e apresentou título de 400 na recaptura, sendo apenas o último resultado apresentado na Tabela 1.

Registramos a ocorrência de nove sorovares infectantes, com alguns animais sendo positivos para mais de uma variedade, visto que apresentaram títulos sorológicos equivalentes. Sob essa análise, entre as jaguatiricas o sorovar de maior frequência foi Pomona-CDC, acometendo 55% dos indivíduos positivos (5/9). Já entre os cachorros-do-mato, o sorovar de maior frequência foi Bratislava, infectando 62% dos animais positivos (5/8) (Tab. 1). Com essa análise, 40 das 63 reações de positividade que detectamos foram excluídas. Se consideradas, os sorovares ocorrentes na região passariam de nove para 17, sendo Cynopteri e Bratislava os mais prevalentes (Fig. 3). Vale ressaltar que 22 das 40 reações que seriam excluídas apresentaram  $T \geq 400$ .

Todas as amostras de sangue total ( $n=26$ ) foram negativas no teste molecular de triagem para fragmento do gene *rrs* para DNA de *Leptospira* spp., bem como as amostras urinárias ( $n=5$ ) – todos os animais com amostras de urina testadas foram soropositivos, com os seguintes títulos para sorovares infectantes:  $T=400$  para Bratislava e Canicola;  $T=1.600$  para Cynopteri;  $T=400$  para Bratislava e Bataviae;  $T=6.400$  para Canicola; e  $T=1.600$  para Australis e Bratislava. A avaliação das amostras para urocultura não foi possível por consequência de contaminação.



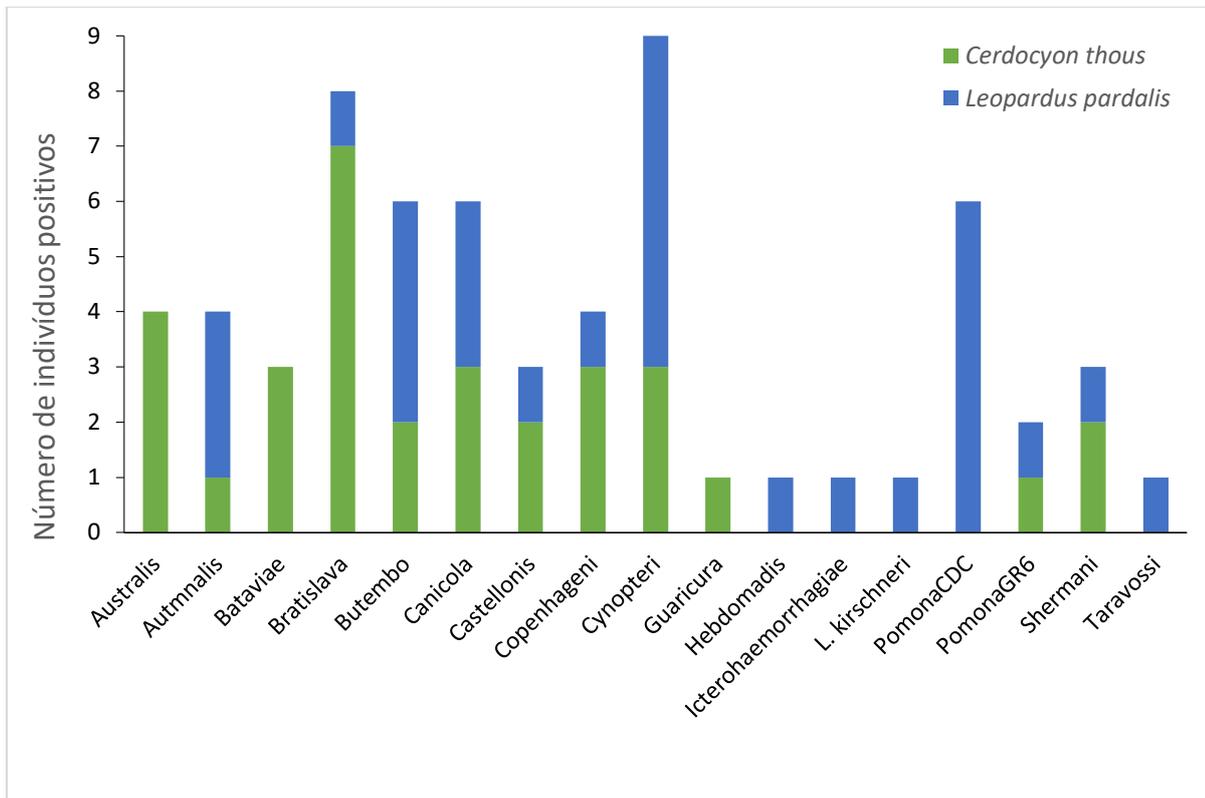


Figura 3: Distribuição dos sorovares de *Leptospira* spp. reagentes em Teste de Soroaglutinação Microscópica em jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) capturados entre agosto e dezembro de 2018 em mosaico de lavoura de arroz, de pastagem e de área preservada no Pantanal de Miranda, Brasil.

#### 4. Discussão

Este estudo investigou a ocorrência de *Leptospira* spp. e a distribuição de seus sorovares em carnívoros silvestres em um mosaico de lavouras de arroz, pastagens para gado e área preservada no Pantanal de Miranda, MS, Brasil. Encontramos alta soroprevalência em jaguatiricas e cachorros-do-mato, com títulos variando entre 200 e 6.400, e circulação de pelo menos nove variantes na região. Apresentamos o primeiro relato da ocorrência dos sorovares Cynopteri, Butembo e Bataviae em carnívoros silvestres no Brasil. O grande número de animais com altos títulos sorológicos, aliado à soroconversão de um animal recapturado, indicam a ocorrência de um ciclo de transmissão ativo na área. A partir disso e do conhecido potencial de carnívoros silvestres como eliminadores da bactéria pela urina, apontamos para a importância desses animais no ciclo epidemiológico da *Leptospira* spp. na região.

##### 4.1 Prevalência de *Leptospira* spp.

A soroprevalência de *Leptospira* spp. que encontramos nesse trabalho (68%) se encontra entre os valores mais altos registrados em carnívoros de vida livre no Brasil, que variaram entre 15% e 86% (Souza Júnior et al. 2006; Jorge et al. 2011; Vieira et al. 2013, 2016; Silva et al. 2014; da Silva et al. 2015; Furtado et al. 2015; Onuma et al. 2015; Rodrigues et al. 2015; Fornazari et al. 2018). Entre as 13 áreas amostradas nos estudos supracitados, apenas uma, no Pantanal, apresentou valor superior ao que detectamos, sendo o estudo realizado com número inferior de indivíduos (n=7) (Vieira et al. 2016). Para o Cerrado, a maior prevalência foi

de 60% (3/5), seguida de estudo com 35% dos carnívoros positivos (27/77). Encontramos títulos sorológicos variando de 200 a 6.400, com 94% dos animais positivos apresentando  $T \geq 400$ . Ressaltamos que este estudo reportou os títulos mais altos já descritos para cachorros-do-mato e jaguatiricas no Brasil. Comparando com outros carnívoros, apenas um estudo com onças-pintadas (*Panthera onca*) descreveu o valor máximo de 6.400 (Furtado et al. 2015). O grande número de animais com altos títulos sorológicos aponta para presença de um ciclo de transmissão ativo na área, com exposição recente ou infecção ativa, como também foi sugerido por outros autores (Onuma et al. 2015). Outro indício de ciclo ativo é o fato de o indivíduo reamostrado em nosso estudo ter soroconvertido após um mês da primeira captura ( $T_1=0$ ;  $T_2=400$ ). Além disso, devido à relação de aumento de soropositividade em decorrência da idade (de Freitas et al. 2010), a detecção do parasito em animais juvenis ( $n=2$ ) e filhotes ( $n=1$ ) nos faz sugerir, mais uma vez, a ocorrência de um ciclo robusto de *Leptospira* spp. na região.

A circulação ativa da bactéria na área tem alta relevância para a saúde dos animais, uma vez sua motilidade no organismo do hospedeiro facilita que se espalhe, tendo tropismo pelos rins, com capacidade de causar falência renal aguda, também podendo atingir o sistema nervoso central e órgãos como fígado e útero (Langston e Heuter, 2003; Greene et al., 2006). A severidade da infecção varia conforme o sistema imunológico do hospedeiro, que, na área de estudo, pode sofrer estresse pela modificação intensa da paisagem, além da provável imunodepressão gerada pela exposição frequente a agroquímicos (Christin et al. 2004).

Outro fator que influencia a severidade da infecção é a virulência do sorovar (Palaniappan et al. 2007). Em nosso estudo, os sorovares de maior destaque foram Pomona e Bratislava, caracterizados por gerar importante comprometimento hepático e insuficiência renal e hepática, respectivamente (Langston e Heuter, 2003; Goldstein et al, 2006). Destacamos que cada um desses sorovares acometeu apenas uma das espécies estudadas, o que nos faz inferir que jaguatiricas e cachorros-do-mato possuem ciclos de transmissão de *Leptospira* spp. independentes entre si, corroborando com o estudo de Fontana (2011).

Ressaltamos que esse é o primeiro relato da ocorrência dos sorovares Cynopteri, Butembo e Bataviae em carnívoros de vida livre no Brasil, e de Autumnalis e Copenhageni em *L. pardalis*, mesmo sendo variedades investigadas em quase todos os trabalhos publicados para a Ordem Carnivora. Dessa forma, diante da variedade de sorovares detectados, da presença de animais domésticos e da abundância e riqueza de vertebrados silvestres na região, a compreensão dos complexos ciclos de transmissão do parasito na área de estudo é um desafio. Em relação aos animais domésticos, exames realizados em 2018 detectaram os sorovares Bratislava e Pomona com maiores títulos no rebanho bovino e equino (Andrea Coelho, *comunicação pessoal*). Essas foram as mesmas variedades de destaque em nosso trabalho, indicando a sobreposição entre os ciclos, o que é reforçado por capturas e registros de jaguatiricas e de cachorros-do-mato, especialmente, em armadilhamento fotográfico em áreas de pecuária. Quanto aos animais silvestres, correlações também podem ser sugeridas se considerarmos os relatos de *Leptospira* spp. no Pantanal em espécies que ocorrem em nossa área de estudo, como as pertencentes às Ordens Rodentia, Artiodactyla, Perissodactyla, Pilosa e Cingulata (Girio et al. 2004; de Freitas et al. 2010; Vieira et al. 2013; Medici et al. 2014; Miranda et al. 2015; da Silva et al. 2015).

Apesar de reações cruzadas entre sorovares serem comuns na SAM, apresentamos todos os valores obtidos visto que 55% (22/40) das reações excluídas pela análise do sorovar infectante apresentaram  $T \geq 400$ .

Além disso, considerando que o tempo para atingir o título máximo é sorovar-dependente (Martin et al. 2014), seus títulos finais podem ter sido influenciados para baixo.

A não detecção de DNA de *Leptospira* nas amostras pode ser justificada pelo caráter intermitente da leptospiúria, especialmente em animais assintomáticos (Faine et al. 1999), e pela bactéria circular no sangue por cerca de apenas sete dias durante seu ciclo biológico (Ellis 1994). Em relação à análise da urina, seu pH naturalmente ácido em carnívoros também pode ter influenciado o resultado por acelerar a degradação do material genético da bactéria (Cordeiro et al. 2019). Ao contornar esse fator, Fornazari et al. (2018) detectaram leptospiúria em 6% dos carnívoros amostrados.

Em relação à cultura, além da conhecida dificuldade de isolamento de *Leptospira* spp. (Faine et al. 1999), as condições adversas comuns em trabalhos de campo, como manutenção das amostras à temperatura ideal e longo tempo até o transporte ao laboratório, podem ter contribuído para os a contaminação dos meios, impossibilitando o diagnóstico.

#### 4.2 *Leptospira* spp., lavouras de arroz e One Health

O Pantanal é conhecido por oferecer condições ambientais que favorecem a persistência da *Leptospira* spp., sendo o bioma de maiores prevalências da bactéria na fauna silvestre da América Latina (Vieira et al. 2018). Ainda assim, nossos valores tanto de soroprevalência quanto de títulos são os maiores já apresentados em carnívoros silvestres no Brasil, indicando que outros fatores além das condições naturais podem favorecer a rede de transmissão. Silva et al. (2015) sugeriram que a ocorrência de *Leptospira* spp. é influenciada por fatores geoclimáticos, práticas de manejo adotadas e biodiversidade animal. Nesse sentido, um importante diferencial da região estudada é a área destinada para o cultivo de arroz irrigado, já relacionado à ocorrência da *Leptospira* spp. em escalas global e nacional (Schneider et al. 2015, Khan et al. 2017). Dessa forma, é possível que o mosaico da paisagem natural de pantanal e toda sua diversidade e abundância de espécies silvestres associado à plantação de arroz e ao contato próximo entre espécies silvestres e domésticas constitua um ambiente ainda mais favorável à persistência bactéria.

Resultados preliminares na área de estudo com armadilhamento fotográfico indicaram 26 espécies de mamíferos na paisagem, das quais seis utilizam os campos do arroz, com grande número de registros de felinos (Andressa Rocha, dados não publicados). De fato, nossa taxa de captura de jaguatirica, 1,6 vezes superior à outra área de Pantanal (Rocha 2006), corrobora essa informação. Nossa hipótese é que os carnívoros utilizam os campos alagados de lavouras devido à presença de pequenos roedores, que por sua vez são atraídos pelos recursos providos pelo arrozal. Neste cenário, o contato estreito entre as jaguatiricas e roedores, considerados os principais reservatórios da *Leptospira* spp., estaria favorecendo a transmissão da *Leptospira* spp., especialmente em um ambiente alagado, propício para sua manutenção.

Considerando que carnívoros podem desenvolver a forma clínica da infecção, inclusive de modo fatal e com título sorológico até 16x inferior aos que obtivemos (Lilenbaum et al. 2004), nossos resultados indicam importante risco para sua conservação. Considerando o potencial imunodepressor que agrotóxicos possuem para algumas espécies (Christin et al. 2004), o risco para a saúde dos carnívoros pode ser aumentado pela frequente aeropulverização de agroquímicos na área de estudo, favorecendo assim, quadros mais graves da doença. Não obstante, ao terem potencial de eliminar a bactéria pela urina e tendo extensas áreas de vida,

esses animais podem atuar como dispersores indiretos da *Leptospira* spp. para a grande diversidade de fauna susceptível na região.

O impacto da *Leptospira* spp. na região já é demonstrado na pecuária, com importantes perdas anuais do rebanho pela doença (Andrea Coelho, *comunicação pessoal*). Entre as recomendações para controle da leptospirose em bovinos estão a detecção das fontes do parasito e quais variantes ocorrem. Como carnívoros possuem amplas áreas de vida, é provável que carreguem variantes da fauna silvestre para as pastagens. Sem a influência desses animais, os bovinos não teriam acesso a tais variedades. A partir dos sorovares que detectamos nos carnívoros, seria importante ampliar o painel investigado também no rebanho. A confirmação de mais variantes de origem silvestre em bovinos poderia auxiliar, inclusive, na prevenção por meio de vacinas, que atualmente são desenvolvidas para um número restrito de sorovares.

Ressaltamos, por fim, a importância da *Leptospira* spp. para a saúde pública. Mesmo que a determinação do título de corte para manifestação clínica da doença no ser humano seja proporcional ao nível de exposição da população (Levett 2001), os valores que apresentamos são suficientemente altos mesmo para populações muito expostas. Dessa forma, considerando que a principal via de transmissão da *Leptospira* spp. é por contato com água contaminada pela bactéria, recomendamos fortemente o uso de equipamentos de proteção individual especialmente entre os funcionários da lavoura, além da investigação da bactéria nesse grupo de risco. Uma outra ferramenta que pode auxiliar no entendimento do ciclo da *Leptospira* spp. na área é a investigação da bactéria em amostras de água dos canais de irrigação.

**Agradecimentos:** CAPES pelo auxílio financeiro de quatro bolsistas; apoio local e estrutural da Fazenda; Laboratório de Mamíferos da Universidade Federal da Paraíba; Laboratório Insana-Huna da Universidade Católica Dom Bosco; Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Universidade de São Paulo - CNPq 420110/2018-6.

## Referências

- Acha, P., & Szyfres, B. (2003). Leptospirosis In: Zoonosis y Enfermedades Transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, vol. 1, p. 175-186.
- Amaral, L. L. D. (2016). Leptospirose ocupacional: perfil de trabalhadores da área rural do município de Estrela, RS.
- Araujo, A. G. D. J., Obregón, G. O., Sampaio, G., Monteiro, A. M. V., da Silva, L. T., Soriano, B., ... & Farias, J. F. S. (2018). Relationships between variability in precipitation, river levels, and beef cattle production in the Brazilian Pantanal. *Wetlands ecology and management*, 26(5), 829-848.
- Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., ... & Vinetz, J. M. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet infectious diseases*, 3(12), 757-771.
- Bolin, C. 2000. Leptospirosis, p. 185–200. In C. Brown and C. Bolin (ed.), *Emerging diseases of animals*. ASM Press, Washington, D.C.
- Cheida, C.C., Nakano-Oliveira E., Fusco-Costa, R., Rocha-Mendes, F., Quadros, J. (2011). Ordem Carnívora. Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. Mamíferos do Brasil. 2 ed. p. 235- 288.
- Christin, M. S., Menard, L., Gendron, A. D., Ruby, S., Cyr, D., Marcogliese, D. J., ... e Fournier, M. (2004). Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquatic toxicology*, 67(1), 33-43.

Concone, H. V. B. (2004). Aspectos da dieta alimentar de jaguatirica (*Leopardus pardalis*, Felidae) em um ambiente antropizado no Pantanal de Miranda (Mato Grosso do Sul). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande – MS.

Cordeiro, C. T., Valente, J. D. M., dos Santos, L. G., da Costa Vieira, R. F., Vieira, T. S. W. J., & de Oliveira Stedile, S. T. (2019). Comparison of three protocols to preserve *Leptospira* spp. in cat urine for efficient DNA extraction and PCR amplification. *Acta Scientiae Veterinariae*, 47.

Corrêa, S. H. R., Vasconcellos, S. A., Morais, Z., Teixeira, A. A., Dias, R.A., Guimarães, M. A. B. V., Ferreira, F., Ferreira-Neto, J.S. (2004). Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. *Braz J Vet Res Anim Sci* 41: 189-193

Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., ... & Ko, A. I. (2015). Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(9), e0003898.

da Silva, F. J., dos Santos, C. E. P., Silva, T. R., Silva, G. C. P., Loffler, S. G., Brihuega, B., ... & Mathias, L. A. (2015). Pesquisa de leptospirosas e de anticorpos contra leptospirosas em animais e humanos de propriedades rurais nos biomas brasileiros Pantanal e Caatinga. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 52(3), 234-248.

da Silva Pinto, P., Libonati, H., Penna, B., & Lilenbaum, W. (2016). A systematic review on the microscopic agglutination test seroepidemiology of bovine leptospirosis in Latin America. *Tropical animal health and production*, 48(2), 239-248.

de Freitas, T. P. T., Keuroghlian, A., Eaton, D. P., de Freitas, E. B., Figueiredo, A., Nakazato, L., ... & Lima, J. V. B. (2010). Prevalence of *Leptospira interrogans* antibodies in free-ranging *Tayassu pecari* of the Southern Pantanal, Brazil, an ecosystem where wildlife and cattle interact. *Tropical animal health and production*, 42(8), 1695-1703.

Ellis, W. A. (1994). Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 10(3), 463-478.

Ellis W.A. (2015) Animal Leptospirosis. In: Adler B. (eds) *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 387. Springer, Berlin, Heidelberg.

Faine, S., Adler, B., Bolin, C., & Perolat, P. (1999). *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne. *Australia: MediSci*, 259.

Fajriyah, S. N., Udiyono, A., & Saraswati, L. D. (2017, February). Environmental and risk factors of leptospirosis: a spatial analysis in Semarang City. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 55, No. 1, p. 012013). IOP Publishing.

Fontana, I. (2011). *Avaliação do papel do porco monteiro na cadeia epidemiológica da leptospirose em sub-regiões do Pantanal sul-mato-grossense* (Doctoral dissertation, Dissertação de Mestrado em Saúde Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília).

Fornazari, F., Langoni, H., Marson, P. M., Nóbrega, D. B., & Teixeira, C. R. (2018). *Leptospira* reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents. *Acta tropica*, 178, 205-212.

Furtado, M. M., Gennari, S. M., Ikuta, C. Y., de Almeida Jacomo, A. T., de Morais, Z. M., de Jesus Pena, H. F., ... & Tôrres, N. M. (2015). Serosurvey of smooth *Brucella*, *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* in free-ranging jaguars (*Panthera onca*) and domestic animals from Brazil. *PloS one*, 10(11), e0143816.

Girio, R. J. S., Pereira, F. L. G., Marchiori Filho, M., Mathias, L. A., Herreira, R. D. C. P., Alessi, A. C., & Girio, T. M. S. (2004). Investigation of antibodies to *Leptospira* spp. in wild and feral animals from the region of Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brazil: use of the immunohistochemistry technique for the agent detection. *Ciência Rural*, 34(1), 165-169.

Goldstein, R. E., Lin, R. C., Langston, C. E., Scrivani, P. V., Erb, H. N., & Barr, S. C. (2006). Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 20(3), 489-494.

Greene, C. E., Sykes, J. E., Brown, C. A. & Hartmann, K. (2006). Leptospirosis. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3ª ed. Ed C. E. Greene. St. Louis, Saunders Elsevier. p. 402-417.

- Guedes, I. B., de Almeida Araújo, S. A., de Souza, G. O., de Souza Silva, S. O., Taniwaki, S. A., Cortez, A., ... & Heinemann, M. B. (2019). Circulating *Leptospira* species identified in cattle of the Brazilian Amazon. *Acta tropica*, 191, 212-216.
- Jorge, R. S. P., Ferreira, F., Ferreira Neto, J. S., Vasconcellos, S. D. A., Lima, E. D. S., Morais, Z. M. D., e Souza, G. O. D. (2011). Exposure of free-ranging wild carnivores, horses and domestic dogs to *Leptospira* spp in the northern Pantanal, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(4), 441-444
- Jorge, R. S. P., Rocha, F. L., May Júnior, J. A., & Morato, R. G. (2010). Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. *Oecologia Australis*, 14(3): 686-710.
- Junqueira, J. R., & Alfieri, A. A. (2006). Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semina: Ciências Agrárias*, 27(2), 289-298.
- Khan, M. A., Latif, M. Z., Gilani, S. A., & Bukhari, I. (2017). Risk Factors of Leptospirosis in Rice Cultivators as Compared to non Rice Cultivators in Punjab, Pakistan. *Annals of King Edward Medical University*, 23(4), 536-539.
- Langston, C. E., & Heuter, K. J. (2003). Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 33(4), 791-807.
- Levett, P. N. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, n. 14, vol. 2, 296 p.
- Lilenbaum, W., Monteiro, R. V., Albuquerque, C. E., Ristow, P., Fraguas, S., Cardoso, V. S., & Fedullo, L. P. L. (2004). Leptospiral antibodies in wild felines from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *Veterinary journal*.
- Martin, L. E. R., Wiggans, K. T., Wennogle, S. A., Curtis, K., Chandrashekar, R., & Lappin, M. R. (2014). Vaccine-associated *Leptospira* antibodies in client-owned dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 28(3), 789-792.
- Medici, E. P., Mangini, P. R., & Fernandes-Santos, R. C. (2014). Health assessment of wild lowland tapir (*Tapirus Terrestris*) populations in the Atlantic forest and Pantanal biomes, Brazil (1996–2012). *Journal of Wildlife Diseases*, 50(4), 817-828.
- Merien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., & Saint Girons, I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of clinical microbiology*, 30(9), 2219-2224.
- Miashiro, A. F., VASCONCELOS, S., de Morais, Z. M., de Souza, G. O., Leal Filho, J. M., FIGUEIREDO, A. D. O., & Pellegrin, A. O. (2018). Prevalência de leptospirose em rebanhos bovinos no Pantanal de Mato Grosso do Sul. *Embrapa Pantanal-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Millán, J., García, E. J., Oleaga, Á., López-Bao, J. V., Llana, L., Palacios, V., ... & León-Vizcaíno, L. (2014). Using a top predator as a sentinel for environmental contamination with pathogenic bacteria: the Iberian wolf and leptospires. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(8), 1041-1044.
- Miraglia, F., Moreno, A.M., Gomes, C.R., Paixão, R., Liuson, E., Morais, Z.M., Maiorka, P.C., Seixas, F.K., Dellagostin, O.A., Vasconcellos, S.A. (2008). Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* form pigs slaughtered in São Paulo State, Brazil.
- Miraglia, F., Moreno, L. Z., Morais, Z. M., Langoni, H., Shimabukuro, F. H., Dellagostin, O. A., ... & Moreno, A. M. (2015). Characterization of *Leptospira interrogans* serovar Pomona isolated from swine in Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(10), 1054-1061.
- Miranda, F. R., Superina, M., Vinci, F., Hashimoto, V., Freitas, J. C., & Matushima, E. R. (2015). Serosurvey of *Leptospira interrogans*, *Brucella abortus* and *Chlamydia abortus* infection in free-ranging giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*) from Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(5), 462-465.
- Olifiers, N., de Cassia Bianchi, R., D'Andrea, P. S., Mourao, G., & Gompper, M. E. (2010). Estimating age of carnivores from the Pantanal region of Brazil. *Wildlife Biology*, 16(4), 389-400.
- Onuma, S. S. M., Kantek, D. L. Z., Crawshaw Junior, P. G., Morato, R. G., May-Junior, J. A., MORAIS, Z. M. D., ... e AGUIAR, D. M. D. (2015). Detection of *Leptospira* spp. and *Brucella abortus* antibodies in free-living jaguars (*Panthera onca*) in two protected areas of Northern Pantanal, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(2), 177-180.
- Palaniappan, R. U., Ramanujam, S., & Chang, Y. F. (2007). Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Current opinion in infectious diseases*, 20(3), 284-292.

Rocha, F. L. (2006). *Áreas de uso e seleção de habitats de três espécies de carnívoros de médio porte na Fazenda Nhumirim e arredores, Pantanal da Nhecolândia, MS* (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande – MS.

Rodrigues, T., Santos, A. L., Lima-Ribeiro, A., Lemos, F. G., Azevedo, F. C., Arrais, R. C., ... e Tavares, T. C. (2015). Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp. in free-ranging wild canids from the Brazilian savanna. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(8), 734-740.

Sahneh, E., Delpisheh, A., Sayehmiri, K., Khodabakhshi, B., & Moafi-Madani, M. (2019). Investigation of Risk Factors Associated with Leptospirosis in the North of Iran (2011-2017). *Journal of Research in Health Sciences*, 19(2).

Schneider, M. C., Najera, P., Pereira, M. M., Machado, G., dos Anjos, C. B., Rodrigues, R. O., ... e Buss, D. F. (2015). Leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: an ecosystem approach in the animal-human interface. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(11), e0004095.

Sikes, R. S., & Gannon, W. L. (2011). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of mammalogy*, 92(1), 235-253.

Silva, F. J., Santos, C. E., Silva, G. C., Santos, R. F., Curci, V., & Mathias, L. A. (2014). The importance of *Leptospira interrogans* serovars Icterohaemorrhagiae and Canicola in coastal zone and in southern fields of Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(1), 34-38.

Silva, J. D. S. V., & Abdon, M. D. M. (1998). Delimitação do pantanal brasileiro e suas sub-regiões. *Área de Informação da Sede-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.

Silva, M. P. D., Mauro, R., Mourao, G., & Coutinho, M. (2000). Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. *Revista brasileira de Botânica*, 23(2), 143-152.

SINAN 2019. Óbitos por Leptospirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2017. <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/09/Leptospirose-2000-2017-obitos.pdf> (acessado em 20 julho 2019).

Souza Júnior, M. F. D., Lobato, Z. I. P., Lobato, F. C. F., Moreira, E. C., Oliveira, R. R. D., Leite, G. G., ... & Assis, R. A. D. (2006). Presença de anticorpos da classe IgM de *Leptospira interrogans* em animais silvestres do Estado do Tocantins, 2002. *Rev Soc Bras Med Trop*, 39(3), 292-294.

Teribebe, R. (2007). Comparações entre taxas de encontro de mamíferos de médio e grande porte em focagens noturnas, em dois períodos sazonais, na Fazenda San Francisco (Pantanal, Miranda–Mato Grosso do Sul).

Vieira, A. S., Rosinha, G. M. S., Vasconcellos, S. A., MORAIS, Z. D., Viana, R. C., OLIVEIRA, C. D., ... & Olifiers, N. (2013). Identificação de mamíferos silvestres do Pantanal sul-mato-grossense portadores de *Leptospira* spp. *Embrapa Gado de Corte-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.

Vieira, A. S., Narduche, L., Martins, G., Péres, I. A. S., Zimmermann, N. P., Juliano, R. S., ... & Lilenbaum, W. (2016). Detection of wild animals as carriers of *Leptospira* by PCR in the Pantanal biome, Brazil. *Acta tropica*, 163, 87-89.

Vieira, A. S., Pinto, P. S., & Lilenbaum, W. (2018). A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. *Tropical animal health and production*, 50(2), 229-238.

Vilaichone, R. K., V. Mahachai, and H. Wilde. 1999. Acute acalculous cholecystitis in leptospirosis. *J. Clin. Gastroenterol.* 29:280–283.

Welsh, J., and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213–7218.

World Health Organization, International Leptospirosis Society. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. Geneva, Switzerland: WHO; 2003.

Zacarias, F. G. D. S., Vasconcellos, S. A., Anzai, E. K., Giraldo, N., Freitas, J. C. D., & Hartskeerl, R. (2008). Isolation of *Leptospira* serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the state of Parana, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(4), 744-748.

## CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos métodos empregados de investigação parasitológica em carnívoros, bem como de avaliação de suas condições de saúde, concluímos:

- Há circulação de pelo menos 14 parasitos entre carnívoros na área (vírus da raiva, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Crithidia mellificae*, *Leptospira* spp., *Hepatozoon* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma* spp., *Cytauxzoon felis*, *Babesia* spp., *Rangelia vitalli* e *Toxoplasma gondii*), com sete apresentando altas prevalências, sendo as coinfeções comuns, variando de dois a nove parasitos por indivíduo;
- Os dados parasitológicos associados às alterações clínicas e laboratoriais indicam que os animais amostrados apresentam baixas condições de saúde;
- Jaguatiricas apresentaram condições de saúde mais baixas que cachorros-do-mato, possivelmente devido à dieta carnívora estrita que aumenta contato com mais espécies e diminui competência imunológica em situações de estresse ou coinfeções;
- Há ocorrência de ciclo ativo de *Leptospira* spp. na região, sendo os sorovares Pomona e Bratislava os infectantes mais comuns em jaguatiricas e cachorros-do-mato, respectivamente;
- A primeira detecção do tripanossomatídeo *Crithidia mellificae* em carnívoros, do piroplasmídeo *Rangelia vitallii* em vertebrados no Pantanal, de *Leishmania* spp. em jaguatiricas de vida livre no Brasil, dos sorovares de *Leptospira* spp. Cynopteri, Butembo e Bataviae em carnívoros de vida livre e de Autumnalis e Copenhageni em jaguatiricas indicam que a área favorece a ocorrência de novas espécies de parasitos/sorovares e indica a importância de ampliar os painéis investigados;
- Os resultados ressaltam a importância de estudar impactos de exposição frequente a agrotóxicos e demais consequência do agroecossistema onde os animais foram amostrados, visto que o conceito de Saúde Única envolve a agroecologia como ferramenta de promoção de saúde humana e animal.
- Por fim, ressalta-se a importância de se levar os resultados obtidos à comunidade, buscando a integração do conhecimento e sensibilização local, com desenvolvimento de dinâmicas de grupo que encontrem sugestões para mitigação da problemática.