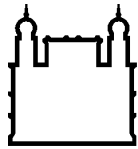


**MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA**

**ESTUDO LONGITUDINAL DA INFECÇÃO POR HANTAVIRUS EM  
ROEDORES SILVESTRES NO ESTADO DO PARANÁ**

**BERNARDO RODRIGUES TEIXEIRA**

Rio de Janeiro  
Outubro de 2013



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA**

**BERNARDO RODRIGUES TEIXEIRA**

**ESTUDO LONGITUDINAL DA INFECÇÃO POR HANTAVIRUS EM  
ROEDORES SILVESTRES NO ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como  
parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor  
em Ciências

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Sérgio D'Andrea

**Rio de Janeiro**

Outubro, 2013

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

T266 Teixeira, Bernardo Rodrigues

Estudo longitudinal da infecção por hantavirus em roedores silvestres no estado do Paraná / Bernardo Rodrigues Teixeira. – Rio de Janeiro, 2013.

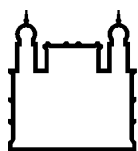
xvi, 139 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2013.

Bibliografia: f. 118-139

1. Hantavírus. 2. Roedores silvestres. 3. Paraná. 4. Ecologia. 5. Microhabitat. I. Título.

CDD 616.918



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA**

**TESE DE DOUTORADO**

**BERNARDO RODRIGUES TEIXEIRA**

**ESTUDO LONGITUDINAL DA INFECÇÃO POR HANTAVIRUS EM  
ROEDORES SILVESTRES NO ESTADO DO PARANÁ**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Sérgio D'Andrea**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**EXAMINADORES:**

---

**Profª. Drª. Elizabeth Ferreira Rangel – Presidente**  
Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ

---

**Profª. Drª. Alzira Maria Paiva de Almeida – Membro (Revisora)**  
Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ

---

**Profª. Drª. Helena de Godoy Bergallo – Membro**  
Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ

---

**Prof. Dr. Darcílio Fernandes Baptista – Suplente**  
Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ

---

**Profª. Drª. Maja Kajin – Suplente**  
Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ

Rio de Janeiro, 31 de outubro de 2013

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paulo Sérgio D’Andrea, por ter me orientado não somente nesta tese, mas por ser meu orientador desde a iniciação científica. Obrigado pela confiança, pelas oportunidades profissionais ao longo de todos estes anos, pela visão interdisciplinar e por investir na minha formação científica e até mesmo na área de gestão.

À Dr<sup>a</sup> Elba Lemos pela co-orientação nesta tese e parceria neste e em outros projetos, permitindo que todas as análises diagnósticas fossem realizadas em seu laboratório. Obrigado pelo apoio em todos os momentos de desenvolvimento deste trabalho e pela confiança depositada em minhas idéias.

À Dr<sup>a</sup> Ana Maria Jansen pela orientação durante parte desta tese. Obrigado pelo apoio quando do meu ingresso nesta pós-graduação e pelo incentivo e contribuições principalmente no seminário discente.

À minha esposa Cecília Siliansky pelas contribuições essenciais na análise de dados, pelo amor, apoio incondicional, carinho e paciência durante todos estes anos. Aos meus pais, irmã e avós pelo constante apoio em todos os campos da minha vida e por todo esforço e dedicação na minha formação.

À Liana Strecht, meu braço direito, que contribuiu em todas as etapas de desenvolvimento desta tese, participando de todas as excursões de campo, da coleta dos dados de micro-habitat, organização das amostras, análises sorológicas e como minha aluna de iniciação científica desenvolvendo parte deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Rosana Gentile pela parceria em todas as análises de dados desta tese, na orientação de alunos e na avaliação do texto final, melhorando a forma de interpretação dos dados.

À Dr<sup>a</sup> Cláudia Santos e equipe do Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ-PR, Sônia Raboni, Suzana Carstensen e Vanessa Stella, pela parceria estabelecida em parte deste projeto.

À Gisélia Rubio, chefe da Divisão de Zoonoses e Intoxicações da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA-PR), que acreditou neste projeto e contribuiu com toda a logística necessária para realização das excursões de campo. A parceria de Gisélia e toda sua equipe foi fundamental para a viabilização desta tese.

Aos profissionais da SESA-PR que participaram de todas as expedições de campo e formaram uma equipe de alto nível para coleta de dados, principalmente em General Carneiro, aonde o volume de trabalho era pesado! Obrigado a todos da equipe “Ratos do Asfalto” pelo

profissionalismo e por tornar o ambiente de trabalho sempre agradável: Edison Santos, Edilson Semczuk (SMS Foz do Iguaçu), Ricardo Matsuo, Joel Lopes, Luiz Eduardo e Elizeu Silva.

Aos profissionais das Regionais e Secretarias Municipais de Saúde dos municípios envolvidos (Paranaguá, Itambaracá, Jaguariaíva, Curitiba, Araucária e Foz do Iguaçu), em especial para as equipes da 6ª Regional de Saúde – União da Vitória e Secretaria Municipal de Saúde de General Carneiro/PR pelo apoio durante o estudo de 2 anos em General Carneiro.

Aos proprietários das áreas de estudo em todos os municípios de trabalho, em especial aos de General Carneiro (Fazenda São Zacharias e Madeireira Pizzatto). À Luciano Pizzatto por ter cedido o espaço e estrutura para montagem do laboratório de campo, além de todas as facilidades que nos foram concedidas. Agradeço ao apoio de sua equipe: Luciane Dubinski, Adrineu, Gladys Freitas, Luiza Pizzatto e Amarildo.

À Nathalie Loureiro, aluna de iniciação científica sob minha orientação em parceria com a Drª Rosana Gentile, pela organização dos dados populacionais dos roedores e contribuição para a discussão final dos resultados obtidos.

À toda equipe do LHR, em especial Renata Oliveira, Alexandro Guterres, Jorlan Fernandes e Luciana Mattos, pelo apoio na realização dos testes diagnósticos, pelo aprendizado em biologia molecular e pelas discussões que tanto contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

À Drª Cibele Rodrigues Bonvicino e toda equipe do Instituto Nacional do Câncer pelo apoio e orientação na sistemática de roedores, principalmente em técnicas citogenéticas.

Ao Dr. Arnaldo Maldonado Júnior, chefe do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, pelo incentivo, discussões e sugestões. À todos os amigos do LABPMR em especial a Michele Santos, Jonathan Gonçalves, Sócrates Neto e Jeiel Gabrir pelo apoio nas excursões de campo e na preparação da coleção científica de roedores.

Ao grande amigo Fabiano Fernandes pelo apoio em diversos momentos desta tese, em especial pela ajuda no sequenciamento de DNA dos roedores infectados por hantavírus.

À Drª Helena Bergallo e Natalie Olifiers pelas contribuições e apoio nas análises estatísticas de ecologia de comunidades.

À Fabiana Caramaschi pelo apoio na identificação específica dos marsupiais coletados.

À Drª. Marli Maria Lima, minha primeira orientadora na FIOCRUZ, pelo incentivo e por permitir que eu utilizasse o espaço do seu laboratório nos momentos de reclusão para escrever esta tese.

À Carolina Valença pela ajuda no sequenciamento de DNA dos roedores infectados por hantavírus.

À Isabel Homczinski e Poliana Sidol, da Universidade de União da Vitória, pelo apoio na coleta de dados de micro-habitat e pela identificação das espécies de vegetais das áreas de estudo.

Às amigas Marlene Burack e Linda Burack, que tornaram nosso ambiente de trabalho em General Carneiro mais agradável e mais bem nutrido.

Aos amigos André Roque, Vanderson Vaz, Júlio Vilela, Marconny Gerhardt, Pedro Estrela, Fabiana Rocha, Mario Gatti e Riccardo Mugnai, pelo incentivo, discussões e boas idéias para o desenvolvimento deste e de outros projetos.

Aos motoristas Jorge Pinto, Jorge Paixão e José Wandique, pela amizade e ajuda em todas as etapas dos trabalhos de campo.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária pelo enriquecimento científico nas aulas ministradas durante o curso e aos colegas de curso pela amizade durante estes quatro anos.

Ao INMET e SIMEPAR pelas informações climáticas das áreas de estudo.

Ao IAP, IBAMA, ICMBIO e administração do Parque Nacional do Iguaçu e Parque Estadual do Cerrado pelas licenças concedidas e suporte logístico durante as expedições de campo.

À CAPES, FIOCRUZ e CNPq pelo suporte financeiro sem o qual nada disso seria possível.

Aos membros da banca pelas contribuições à versão final desta tese.

# ESTUDO LONGITUDINAL DA INFECÇÃO POR HANTAVÍRUS EM ROEDORES SILVESTRES NO ESTADO DO PARANÁ

Tese de Doutorado / Bernardo Rodrigues Teixeira

## RESUMO

A Síndrome Cardio-Pulmonar por Hantavírus (SPH) é uma zoonose cuja emergência está relacionada a alterações ambientais que modificam os padrões de riqueza e abundância das espécies. Nestas situações, espécies de hábitos generalistas/opportunistas podem ser favorecidas, como é o caso das principais espécies de roedores hospedeiros de hantavírus no Brasil. Em geral os hantavírus apresentam uma associação específica entre o genótipo viral e a espécie de roedor hospedeiro, entretanto trabalhos recentes vêm reportando a ocorrência de *spillover* em hospedeiros secundários. No Brasil, são conhecidos nove genótipos virais, sendo cinco associados a roedores e casos de SPH e quatro associados apenas a roedores hospedeiros. O Estado do Paraná é o 4º em número de casos de SPH no Brasil e o município de General Carneiro se localiza na região da Floresta Ombrófila Mista, região que concentra a maioria dos casos do Estado. Este trabalho teve como objetivos: (1) Caracterizar a fauna de pequenos mamíferos e determinar a taxa de infecção por hantavírus em roedores silvestres em quatro unidades de paisagem do Estado do Paraná; (2) realizar um estudo das populações de roedores silvestres e de sua infecção por hantavírus, no município de General Carneiro/PR, considerando os parâmetros populacionais, as variáveis de micro-habitat e a estrutura das comunidades, ao longo de dois anos. A identificação taxonômica foi baseada na análise cariotípica e, quando necessário, pela análise da morfologia craniana. Os espécimes infectados por hantavírus tiveram sua identificação específica confirmada por sequenciamento do gene Citocromo b. O diagnóstico de infecção por hantavírus foi realizado através de ensaio imunoenzimático ELISA, utilizando o antígeno Araraquara, e sequenciamento de DNA. O levantamento de espécies foi realizado em sete municípios do Estado do Paraná e o estudo temporal em General Carneiro foi realizado em seis áreas com diferentes graus de conservação. Foram encontradas no total 14 espécies de roedores e 7 de marsupiais, todas de ocorrência frequente no Estado do Paraná. As principais espécies hospedeiras foram os roedores *Akodon montensis* e *Oligoryzomys nigripes*, associados aos genótipos virais Jaborá (JABV) e Jucituba (JUQV), respectivamente. O grau de conservação das áreas não influenciou a composição das espécies ou a ocorrência de hantavírus no estudo temporal. As quatro espécies infectadas (*Akodon serrensis*, *Akodon montensis*, *Akodon paranaensis*, *Oligoryzomys nigripes*) apresentaram maiores prevalências de infecção na primavera/verão, estações com maior atividade reprodutiva, maior quantidade de indivíduos adultos e menores tamanhos populacionais. Maiores tamanhos populacionais ocorreram no outono/inverno devido à grande quantidade de indivíduos jovens recrutados. Estes padrões populacionais foram semelhantes também para *Oxymycterus judex* e *Thaptomys nigrita*. No estudo total foram identificadas infecções *spillover* em *A. montensis*/JUQV, *O. judex*/JUQV, *A. serrensis*/JABV, *A. paranaensis*/JABV e *A. paranaensis*/JUQV. Estas infecções *spillover* ocorrem em períodos de baixa prevalência nos hospedeiros primários, sendo importantes na manutenção dos genótipos JABV e JUQV no ambiente. A infecção *spillover* entre *A. serrensis* e *A. montensis* está relacionada a ocupação do micro-habitat por estas espécies. A infecção por JABV em roedores está relacionada à uma menor abundância de *A. serrensis*, à presença de roedores machos adultos e à ocorrência da espécie *A. montensis* nas áreas de estudo.



# LONGITUDINAL STUDY OF HANTAVIRUS RODENT HOSTS IN THE STATE OF PARANÁ

Tese de Doutorado / Bernardo Rodrigues Teixeira

## ABSTRACT

Hantavirus cardio-pulmonary syndrome (HPS) is a zoonosis whose emergence is associated to habitat disturbance that alter diversity and abundance of natural communities, thereby favoring generalist/opportunistic rodent species, as is the case of the main species of hantavirus rodent hosts in Brazil. Each hantavirus genotype is associated predominantly with a specific rodent host species; however, an increasing number of studies have reported the occurrence of hantavirus spillover to secondary hosts. Until now, there are nine known viral genotypes in Brazil, five of them are associated with rodents and HPS cases, and the remaining are associated with rodent hosts only. The state of Paraná has one of the highest incidences of HPS in Brazil and the General Carneiro municipality is located in Mixed Ombrophilous Forest, a biome with the highest incidence of HPS in Paraná. This study purpose was (1) to conduct a survey of small mammals and their hantavirus infection in the State of Paraná, southern Brazil; (2) to analyze population dynamics, micro-habitat associations and community structure of rodent hosts and hantavirus infection over a two-year period in General Carneiro municipality. All species were identified by karyotyping or cranial morphology/morphometry. Hantavirus antibody-positive specimens were confirmed by molecular analysis (amplification of the cytochrome b gene). Serum and tissue samples obtained from rodents were submitted to IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using N-Araraquara hantavirus recombinant nucleocapsid protein, and DNA sequencing, respectively. The species survey was conducted in seven counties and the two-year study in General Carneiro was conducted in six sites with different vegetational types. Fourteen rodent species and seven marsupial species were captured, all of them considered common species in Paraná. The main host species were *Akodon montensis* and *Oligoryzomys nigripes* associated with Jaborá Virus genotype (JABV) and Juititaba virus genotype (JUQV), respectively. The species composition and the occurrence of hantavirus were not correlated to any vegetation type in two-year study. A clear pattern of higher hantavirus prevalence in seasons with higher reproductive activity, greater numbers of adult individuals and lower population size was observed for the hantavirus infected species (*A. serrensis*, *A. montensis*, *A. paranaensis*, *O. nigripes*). Increases in rodent abundance occurred in cooler months with higher numbers of younger individuals. These population patterns were also similar for *Oxymycterus judex* and *Thaptomys nigrita*. Spillover infections of *A. montensis*/JUQV, *O. judex*/JUQV, *A. serrensis*/JABV, *A. paranaensis*/JABV and *A. paranaensis*/JUQV were observed. The spillover infections to secondary hosts took place during periods of low prevalence in the primary host, which suggest that secondary hosts may play an important role for maintaining JABV and JUQV sylvatic cycles. The spillover infection between *A. serrensis* and *A. montensis* is related to micro-habitat preferences of these species. The JABV infection in rodents is related to a lower abundance of *A. serrensis* and the occurrence of adult male rodents and *A. montensis* in the study areas.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<i>Transmissão para o homem</i> .....	1
<i>Alterações ambientais</i> .....	2
<i>Casos de SPH no Brasil</i> .....	2
<i>Roedores Hospedeiros de Hantavírus</i> .....	4
<i>Ecologia de populações de roedores hospedeiros</i> .....	6
<i>Ecologia de comunidades, efeito diluidor e micro-habitat</i> .....	8
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	10
<b>OBJETIVOS GERAIS</b> .....	11
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
<i>Estudos de campo</i> .....	12
<i>Identificação Taxonômica</i> .....	13
<i>Diagnóstico de infecção por hantavirus</i> .....	15
<b>CAPÍTULO 1 - Levantamento de espécies de pequenos mamíferos e infecção por hantavírus em roedores silvestres no Estado do Paraná</b> .....	20
<b>OBJETIVOS</b> .....	21
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
<b>RESULTADOS</b> .....	30
<i>Floresta Ombrófila Mista (Municípios de General Carneiro, Curitiba e Araucária)</i> ....	33
<i>Floresta Ombrófila Densa (Município de Paranaguá)</i> .....	34
<i>Floresta Estacional Semidecidual (Municípios de Itambaracá e Foz do Iguaçu)</i> .....	34
<i>Remanescentes de Cerrado e Fragmentos Florestais (Município de Jaguariaíva)</i> .....	36
<b>DISCUSSÃO</b> .....	37

<i>Riqueza e composição de espécies das áreas estudadas no Estado do Paraná</i> .....	37
<i>Unidades de Paisagem e Regiões Estudadas</i> .....	38
<i>Espécies Amostradas e Áreas de Ocorrência</i> .....	39
<i>Diagnóstico de Infecção por Hantavirus</i> .....	42
<b>ARTIGO 1. Short Communication - Phylogenetic characterization of hantaviruses from wild rodents and hantavirus pulmonary syndrome cases in the state of Paraná (southern Brazil)</b> .....	44
<i>Abstract</i> .....	44
<b>ARTIGO 2. Hantavirus infection prevalence in wild rodents and human anti-hantavirus serological profiles from different geographic areas of South Brazil</b> ...	50
<i>Abstract</i> .....	50
<i>Introduction</i> .....	50
<i>Material and Methods</i> .....	50
<i>Results</i> .....	51
<i>Discussion</i> .....	54
<b>CAPÍTULO 2 - Ecologia de populações de roedores silvestres e dinâmica temporal de infecção por hantavírus, no município de General Carneiro, sul do Estado do Paraná</b> .....	58
<b>ARTIGO 3. Population ecology of hantavirus rodent hosts in Southern Brazil</b> ....	60
<i>Abstract</i> .....	61
<i>Introduction</i> .....	61
<i>Material and Methods</i> .....	63
<i>Results</i> .....	65
<i>Discussion</i> .....	67
<b>ANEXO</b> .....	85
<b>CAPÍTULO 3 - Ecologia de comunidades de roedores hospedeiros de hantavírus, no município de General Carneiro, sul do Estado do Paraná</b> .....	89
<b>OBJETIVOS</b> .....	90
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	90
<i>Área de estudo</i> .....	90
<i>Desenho Amostral e Esforço de Captura</i> .....	97

<i>Estudo do Micro-habitat</i> .....	98
<i>Análise de parâmetros de comunidades</i> .....	100
<i>Análise de parâmetros da infecção por hantavírus</i> .....	101
<b>RESULTADOS</b> .....	102
<i>Classificação das áreas de estudo</i> .....	102
<i>Comunidades de pequenos mamíferos</i> .....	103
<i>Estudo do Micro-habitat</i> .....	105
<i>Análise de parâmetros de comunidades</i> .....	106
<i>Análise de parâmetros da infecção por hantavírus</i> .....	108
<b>DISCUSSÃO</b> .....	110
<i>Comunidades de pequenos mamíferos</i> .....	110
<i>Análise de parâmetros de comunidades</i> .....	112
<i>Estudo do Micro-habitat</i> .....	113
<i>Co-ocorrência de espécies</i> .....	114
<i>Análise de parâmetros da infecção por hantavírus</i> .....	114
<b>CONCLUSÕES</b> .....	117
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	118

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1. Número de casos de SPH no Estado do Paraná entre 1999 e 2013.....	3
Figura 2. Distribuição de casos de hantavirose no Estado do Paraná.....	4

### CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Localização dos municípios de coleta no estudo de levantamento de espécies hospedeiras de hantavírus .....	23
Figura 1.2. Áreas estudadas no município de General Carneiro/PR .....	26
Figura 1.3. Áreas estudadas no município de Paranaguá/PR .....	26
Figura 1.4. Áreas estudadas no município de Itambaracá/PR. ....	27
Figura 1.5. Áreas estudadas no município de Foz do Iguaçu/PR .....	27
Figura 1.6. Áreas estudadas no município de Jaguariaíva/PR .....	28
Figura 1.7. Áreas estudadas na zona metropolitana da capital do Estado do Paraná .....	29
Figura 1.8. Aspecto geral das áreas estudadas.....	30
Figura 1.9. Abundância relativa das espécies de pequenos mamíferos capturadas nas unidades de paisagem do Estado do Paraná .....	32
<b>ARTIGO 1.</b> Figure 1. Maximum-likelihood tree based on a 312 nt alignment of the S segment, depicting phylogenetic relationships among hantavirus sequences from Paraná, southern Brazil, and a reference panel of sequences obtained from GenBank .....	46
<b>ARTIGO 1.</b> Figure 2. Maximum-likelihood trees depicting phylogenetic relationships between the ARAUV complete segment M sequence.....	47
<b>ARTIGO 2.</b> Figure 1. State of Paraná, Brazil .....	51
<b>ARTIGO 2.</b> Figure 2. Bayesian phylogenetic analysis of partial S segment sequences from rodents captured in different Paraná localities .....	54
<b>ARTIGO 2.</b> Figure 3. Bayesian phylogenetic analysis of partial S segment sequences from rodents captured in different Paraná localities .....	55

### CAPÍTULO 2

<b>ARTIGO 3.</b> Figure 1. General Carneiro municipality, State of Paraná, southern Brazil .....	82
--	----

<b>ARTIGO 3.</b> Figure 2. Climatic diagram of the study area obtained from December 2009 to December 2011 .....	82
<b>ARTIGO 3.</b> Figure 3. Population sizes, proportion of reproducing females and prevalences of hantavirus infection .....	83
<b>ARTIGO 3.</b> Figure 4. Age structure .....	84
<b>ANEXO.</b> Figura 5. Relações filogenéticas dos hantavírus, inferidas por análise Bayesiana, implementado na ferramenta Mr. Bayes 3.1.2, comparando 380 nucleotídeos do segmento S da região codificante do nucleocapsídeo .....	86
<b>ANEXO.</b> Figura 6. Expansão do clado Jaborá Virus (JABV) .....	87
<b>ANEXO.</b> Figura 7. Expansão do clado Juquitiba Virus (JUQV) .....	88

### **CAPÍTULO 3**

Figura 3.1. Áreas estudadas no período 2009-2011, no município de General Carneiro/PR: Araucárias, Alagado, Bomba, RPPN, Escadaria e São Zacharias .....	91
Figura 3.2. Detalhe das áreas Araucárias e Alagado, no município de General Carneiro/PR .....	91
Figura 3.3. Detalhe das áreas Bomba, RPPN e Escadaria, no município de General Carneiro/PR .....	92
Figura 3.4. Detalhe da área São Zacharias, no município de General Carneiro/PR .....	92
Figura 3.5. Áreas amostradas no estudo realizado entre 2009 e 2011 no município de General Carneiro/PR .....	97
Figura 3.6. Gráfico NMDS (Escalonamento multidimensional) indicando a similaridade entre as áreas estudadas de acordo com as variáveis da paisagem .....	103
Figura 3.7. Gráfico NMDS (Escalonamento multidimensional) indicando a similaridade entre as áreas estudadas de acordo com a abundância das espécies .....	108
Figura 3.8. Prevalência de infecção por JABV e prevalência total de infecção por hantavírus de acordo com a abundância de <i>A. serrensis</i> em cada área de estudo .....	108

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

Tabela 1. Genótipos de hantavírus de ocorrência no Brasil, com seus respectivos roedores hospedeiros e distribuição geográfica .....	5
--	---

### CAPÍTULO 1

Tabela 1.1. Informações gerais sobre o levantamento de espécies de pequenos mamíferos no Estado do Paraná, com descrição das áreas de estudo .....	22
Tabela 1.2. Espécies de pequenos mamíferos coletadas no Estado do Paraná, de acordo com as unidades de paisagem estudadas .....	31
Tabela 1.3. Pequenos mamíferos coletados em áreas de Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucárias), nos municípios de General Carneiro, Curitiba e Araucária, Estado do Paraná .....	33
Tabela 1.4. Pequenos mamíferos coletados em áreas de Floresta Estacional Semidecidual, nos municípios de Itambaracá e Foz do Iguaçu, Estado do Paraná .....	35
Tabela 1.5. Pequenos mamíferos coletados no Parque Estadual do Cerrado e em fragmentos florestais nos arredores, no município de Jaguariaíva, Estado do Paraná ...	36
<b>ARTIGO 1.</b> Table 1. Brazilian hantaviruses and their putative reservoirs.....	45
<b>ARTIGO 2.</b> Table 1. Small mammals captured in State of Paraná, Southern Brazil, 2006–2009 .....	52
<b>ARTIGO 2.</b> Table 2. Collection locations, numbers of small mammals captured, rodent seroprevalence, positive species, hantavirus genotype, and human seroprevalence .....	53

### CAPÍTULO 2

<b>ARTIGO 3.</b> Table 1. Species prevalence, sex and hantavirus genotype of infected specimens (seropositives and PCR confirmed) .....	81
---	----

### CAPÍTULO 3

Tabela 3.1. Características gerais das seis áreas de estudo em General Carneiro/PR ....	94
Tabela 3.2. Porcentagem de cada variável da paisagem e índices de heterogeneidade e complexidade presentes em cada uma das seis áreas de estudo .....	102

Tabela 3.3 – Número total de animais capturados por espécie em cada área de estudo em General Carneiro/PR, de dezembro de 2009 a dezembro de 2011 .....	104
Tabela 3.4 – Índices de heterogeneidade e complexidade em cada uma das seis áreas de estudo, do município de General Carneiro/PR .....	105
Tabela 3.5. Análise de co-ocorrência entre <i>A. serrensis</i> e <i>A. montensis</i> no município de General Carneiro/PR.....	106
Tabela 3.6. Análise de co-ocorrência, entre as espécies capturadas no município de General Carneiro/PR.....	107
Tabela 3.7. Modelo descritivo de ocorrência de hantavírus na região de estudo, baseado em seleção stepwise e no Critério de Informação de Akaike (AIC) .....	109



## INTRODUÇÃO

Zoonoses são doenças transmitidas naturalmente ao homem a partir de infecções que circulam entre animais (OMS 2011). Mais de 60% dos patógenos que afetam a saúde humana são de origem zoonótica, sendo em sua grande maioria de origem viral (Woolhouse & Gowtage-Sequeria 2005). Estima-se ainda que pelo menos 320 mil vírus desconhecidos estejam associados a mamíferos como hospedeiros (Anthony et al. 2013). Uma das principais zoonoses, de ampla distribuição em todo o mundo, é a hantavirose, cuja transmissão é associada principalmente a roedores silvestres e sinantrópicos de diferentes espécies, embora o vírus tenha sido associado também a musaranhos (Superordem Insectivora) (Arai et al. 2007, Kang et al. 2009) e morcegos (Guo et al. 2013). A hantavirose é causada por um vírus do gênero *Hantavírus*, família Bunyaviridae, que pode acarretar duas formas clínicas distintas: a Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) e a Síndrome Pulmonar por Hantavírus (SPH), também conhecida como Síndrome Cardio-Pulmonar por Hantavírus. A primeira, com ocorrência na Europa e Ásia, reconhecida desde 1930 (Lee et al. 1978, Ruo et al. 1994, Olsson et al. 2010, Reusken & Heyman 2013) e a segunda, com ocorrência nas Américas, tem sido registrada desde 1993 (Nichol et al. 1993, Hjelle et al. 1994). No Brasil, durante o mesmo ano, a SPH foi registrada em casos ocorridos no interior de São Paulo (Silva et al. 1997). A SPH apresenta-se, de uma forma geral, como doença febril aguda caracterizada pelo grave comprometimento cardiovascular e respiratório, com um período de incubação que varia entre 9 a 33 dias (média de 14 a 17 dias) (Jonsson et al. 2010).

### *Transmissão para o homem*

A transmissão dos hantavírus para o homem ocorre de maneira acidental, principalmente pela inalação de partículas virais presentes em aerossóis de excretas de roedores silvestres infectados (Lednicky 2003). Outras vias de infecção menos frequentes já documentadas são através de mordeduras de roedores infectados, além da infecção por contato pessoa-pessoa pelo vírus Andes, documentada na Argentina (Padula et al. 1998, Enria & Levis 2004).

A transmissão é facilitada pelo contato com roedores, como ocorre em áreas rurais, principalmente em locais fechados como galpões para armazenamento de grãos, depósitos de fazendas, e habitações construídas próximas a ambientes silvestres. Em locais fechados pode ocorrer uma concentração de aerossóis com partículas virais, tornando este ambiente um local

de risco. Assim, quaisquer atividades realizadas nestes ambientes, como por exemplo limpeza, demolições ou remoção de grãos, constituem fatores de risco para a transmissão desta doença (Zeitz et al. 1995, Mills et al. 2002).

### *Alterações ambientais*

A emergência de SPH, assim como outras zoonoses, tem sido relacionada a situações de perturbações ambientais que em geral resultam na formação de mosaicos de paisagem entre remanescentes de mata nativa e áreas de atividade rural ou de ocupação humana. Estas alterações ambientais causadas pelas atividades humanas têm alterado os padrões de riqueza (redução e perda de espécies) e abundância das espécies, que por sua vez influenciam na dinâmica natural de transmissão de ciclos silvestres de parasitas (Kruse et al. 2004, Mills 2006). Nestas situações, em habitats alterados, poucas espécies de animais (generalistas/oportunistas) são frequentemente favorecidas, possibilitando o incremento de suas densidades e a dispersão para áreas rurais e de interface entre o ambiente silvestre e ambientes peridomiciliares (Mills 2006), resultando em uma maior probabilidade de contato entre populações humanas e parasitos antes restritos aos ciclos silvestres (Fayer 2000, Daszak et al. 2000). Se estas espécies favorecidas forem as mais competentes para a transmissão destes parasitas, poderá haver uma maior eficiência da transmissão, aumentando as taxas de prevalência entre as espécies vetoras e/ou hospedeiras e, por consequência, maior risco de transmissão a seres humanos. Por outro lado, em ambientes com uma maior diversidade de espécies (vetores e hospedeiros), o ciclo de transmissão pode ocorrer entre hospedeiros muito competentes, menos competentes, ou mesmo não-competentes (espécies que não são capazes de retransmitir o vírus e que são chamadas de “*dead-ends*”), controlando a dispersão do parasito (“*efeito diluidor*”) (Schmidt & Ostfeld 2001, Ostfeld & Keesing 2012). De fato, no caso dos hantavírus no Brasil, as principais espécies hospedeiras vêm sendo descritas como espécies de hábitos generalistas/oportunistas, como os roedores *Oligoryzomys nigripes* e *Necromys lasiurus* (Suzuki et al. 2004, Dalmagro & Vieira 2005, Rocha et al. 2011).

### *Casos de SPH no Brasil*

Nesse cenário, a SPH apresenta-se como uma das principais doenças infecciosas emergentes da atualidade no Brasil devido a sua alta taxa de mortalidade, alta morbidade, e de

crescente ocorrência em praticamente todo o território nacional e ausência de medicação específica.

No Brasil, desde os primeiros registros em 1993 até maio de 2013, 1640 casos de SPH foram confirmados pelo Ministério da Saúde, com ampla distribuição entre a maioria dos estados brasileiros e alta taxa de letalidade (aproximadamente 40%; 653 óbitos) (Ministério da Saúde, 2013). Região Sul (583 casos /190 óbitos): Rio Grande do Sul (101/42), Santa Catarina (264/73), Paraná (218/75); Região Sudeste (468/209): Minas Gerais (278/108), São Paulo (190/101); Região Centro-Oeste (412/171): Mato Grosso (248/97), Distrito Federal (88/35), Goiás (75/38), Mato Grosso do Sul (1/1); Região Nordeste (14/8): Maranhão (11/5), Rio Grande do Norte (2/2), Bahia (1/1); e Região Norte (101/45): Pará (91/42), Amazonas (6/2), Rondônia (4/1); Identidade ignorada (63/30).

O Estado do Paraná, região de estudo desta tese, é o 4º em número de casos de SPH no Brasil, sendo o primeiro caso registrado em 1999. Até o momento 218 casos com 75 óbitos foram registrados (Figura 1), principalmente na região centro sul do Estado (Figura 2), região de distribuição da Floresta Ombrófila Mista.

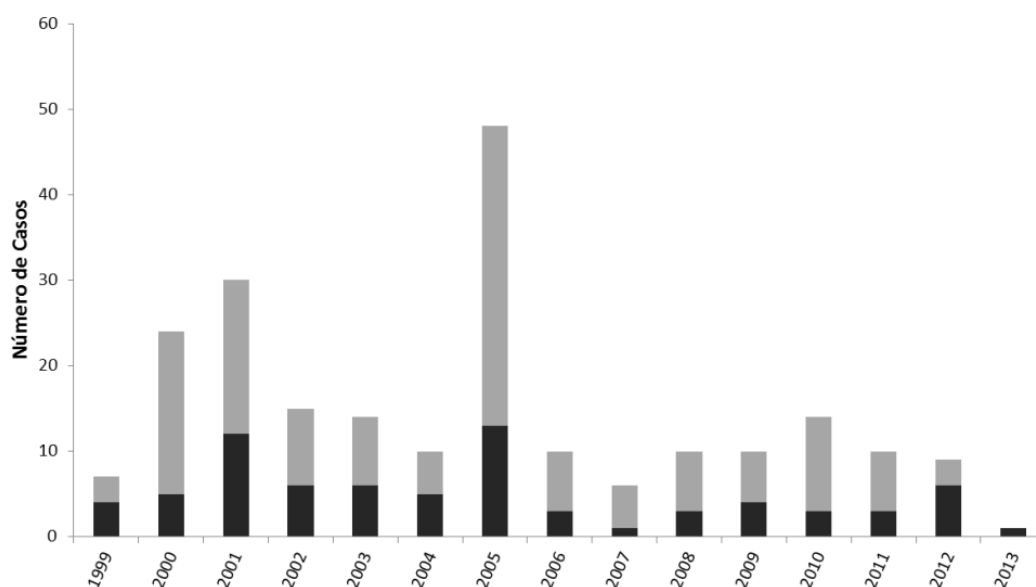


Figura 1. Número de casos de SPH no Estado do Paraná entre 1999 e 2013 (Barras escuras: número de casos que vieram a óbito; Barras claras: número de casos não letais). Dados cedidos pela Secretaria de Saúde do Estado do Paraná.

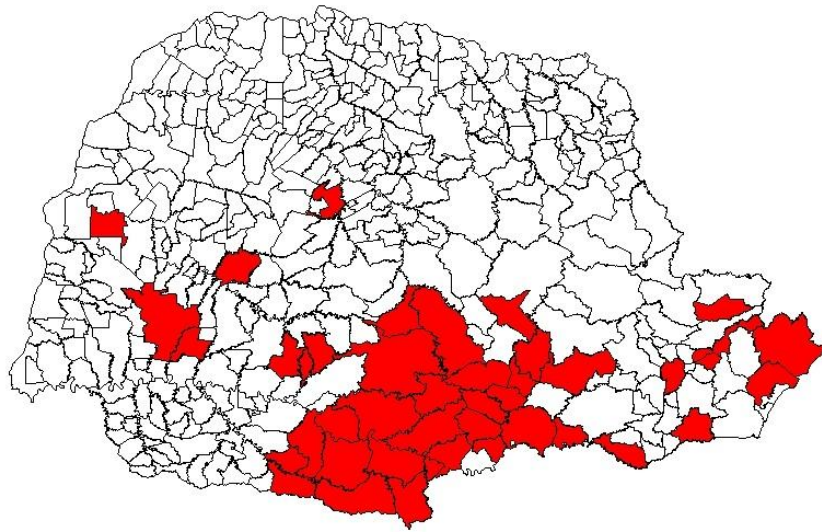


Figura 2. Distribuição de casos de hantavirose no Estado do Paraná. Fonte: Secretaria de Saúde do Estado do Paraná

#### *Roedores Hospedeiros de Hantavírus*

A transmissão dos hantavírus entre os roedores se dá pela transmissão horizontal, através de encontros agonísticos ou através da inalação de aerossóis contaminados (Mills et al. 1999). A presença de cicatrizes em roedores infectados, particularmente nos machos, vem sendo utilizada como um indicativo indireto de encontros agonísticos entre roedores (Glass et al. 1988, Calisher et al. 1999, Hinson et al. 2004, Pereira et al. 2007), reforçando a importância da transmissão mecânica por mordidas e agressões. A transmissão vertical não tem sido observada, possivelmente pela proteção pós-natal oferecida por anticorpos maternos nos roedores neonatos (Kallio et al. 2006, 2010).

Em geral os hantavírus apresentam uma associação específica entre o genótipo viral e a espécie de hospedeiro, devido provavelmente a um processo de co-divergência (Plyusnin et al. 1996, Jackson & Charleston 2004). Mais de 40 genótipos de hantavírus foram reconhecidos no continente Americano, sendo a maioria descritos na América do Sul, muitos comprovadamente causadores da SPH e associados a diferentes espécies de roedores (Hjelle & Torres-Pérez 2010). Todos os hantavírus que causam SPH no Brasil estão ligados a roedores da subfamília Sigmodontinae, apresentando uma associação entre o genótipo viral e a espécie de roedor.

No Brasil, são conhecidos até o momento nove genótipos virais, sendo cinco associados a casos de SPH (Tabela 1): Vírus Juquitiba (JUQV) Vírus Araraquara (ARAV), Vírus Laguna Negra-like (LNV), Vírus Castelo dos Sonhos (CASV) e Vírus Anajatuba (ANAJV). Quatro outros genótipos virais foram descritos apenas em roedores não tendo sido associados à infecção humana no Brasil: Vírus Seoul (SEOV), Vírus Rio Mearim (RIMEV), Vírus Rio Mamoré (RMV) e Vírus Jaborá (JABV). Entretanto SEOV e RMV são associados à infecção humana em outros países (Chan et al. 1987, Casapia et al. 2012). Evidências sorológicas, porém sem detecção e caracterização molecular, foram também encontradas em *Calomys tener*, *Oxymycterus rutilans* (Suzuki et al. 2004), *Sooretamys angouya* (Oliveira et al. 2011) e *Akodon cursor* (Sobreira et al. 2008).

Tabela 1. Genótipos de hantavírus de ocorrência no Brasil, com seus respectivos roedores hospedeiros e distribuição geográfica.

<i>Genótipo Viral</i>	<i>Reservatório primário</i>	<i>Distribuição no Brasil</i>	<i>Referência</i>
<b>Juquitiba</b>	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Mata Atlântica (Sul e Sudeste)	Suzuki et al. 2004, Raboni et al. 2005
<b>Araraquara</b>	<i>Necromys lasiurus</i>	Cerrado (Brasil Central e Sudeste)	Suzuki et al. 2004
<b>Laguna Negra</b>	<i>Calomys callidus</i>	Transição Cerrado e Amazônia (restrito ao Mato Grosso)	Raboni et al. 2009a, Rosa et al. 2012
<b>Castelo dos Sonhos</b>	<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	Amazônia e Transição com o Cerrado (Pará e Mato Grosso)	Johnson et al. 1999, Rosa et al. 2011, Agrellos et al. 2012
<b>Anajatuba</b>	<i>Oligoryzomys fornesi</i>	Áreas de baixada da Amazônia (Maranhão)	Rosa et al. 2005
<b>Seoul</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	Amazônia (Pará)	Leduc et al. 1985, Xiao et al. 1992
<b>Rio Mearim</b>	<i>Holochilus sciureus</i>	Áreas de baixada da Amazônia (Maranhão)	Rosa et al. 2005
<b>Rio Mamore</b>	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Amazônia (Amazonas e Rondônia)	Firth et al. 2012
<b>Jaborá</b>	<i>Akodon montensis</i>	Mata Atlântica (Região Sul)	Oliveira et al. 2011

Apesar do conceito geral de co-divergência e especificidade entre genótipo viral e espécie de hospedeiro, recentes estudos colocam em discussão a hipótese de co-divergência entre sigmodontíneos e hantavírus considerando as taxas de evolução mais rápidas dos vírus (Ramsden et al. 2008). Da mesma forma, a especificidade da relação hantavirus-hospedeiro vem também sendo reavaliada considerando os frequentes *spillovers* encontrados em

hospedeiros secundários (Hjelle & Torres-Pérez 2010). O termo *spillover* se refere à infecção de um ou mais hospedeiros secundários por um genótipo viral associado à outra espécie (hospedeiro primário).

No Brasil a ocorrência de *spillover* foi observada no roedor *Calomys callidus* infectado pelo vírus Laguna Negra (LNV) (Rosa et al. 2012), cujo hospedeiro primário é *Calomys laucha* identificado no Paraguai (Johnson et al. 1997). A espécie *Calomys callosus* também foi encontrada infectada por LNV na Bolívia (Carroll et al. 2005). Neste caso, como *C. callosus* e *C. laucha* não apresentam sobreposição na sua distribuição geográfica, os autores sugerem que LNV infectava o ancestral comum destas espécies e permaneceu associada a ambas. O vírus Anajatuba foi também encontrado em outra espécie (*N. lasiurus*) que não o seu reservatório primário (*O. fornesi*), bem como o vírus Araraquara, cujo reservatório primário é *N. lasiurus*, reportado nos roedores *A. montensis*, *O. nigripes*, *Thaptomys nigrita* e *Juliomys* sp. e *Oryzomys* sp. (Figueiredo et al. 2009, Araujo et al. 2011), além de espécies de marsupiais (*Micoureus paraguayanus*, *Monodelphis iheringi* e *Didelphis aurita*) e morcegos (*Diphylla ecaudata*, *Diphylla ecaudata* e *Anoura caudifer*) (Araujo et al. 2012). Entre os genótipos virais distribuídos na região da Mata Atlântica, JABV foi reportado associado a *A. paranaensis* (Oliveira et al. 2012) e JUQV a *O. nasutus* no Uruguai (Delfraro et al. 2008), bem como a *Oligoryzomys fornesi* e *Oryzomys* sp. no Paraguai (Chu 2009). Entretanto poucas informações a respeito da ecologia e história natural deste tipo de infecção estão disponíveis (Jonsson et al. 2010).

#### *Ecologia de populações de roedores hospedeiros*

Apesar da grande riqueza de espécies de roedores, dos diversos genótipos virais descritos e das frequentes ocorrências de *spillovers*, estudos de hantavírus no Brasil são em geral pontuais identificando os padrões de infecção momentâneos relacionados, geralmente, à emergência de casos humanos em alguma localidade, não levando em consideração a dinâmica temporal dos ciclos de transmissão entre vírus-hospedeiro. Estudos de longo prazo são fundamentais para se compreender os padrões estacionais da infecção nas comunidades e populações de roedores hospedeiros. Assim, dados relativos à infecção como, caracterização de genótipos virais, especificidade parasita-hospedeiro e variação das taxas de infecção podem ser associados aos dados climáticos (Donalisio & Peterson 2011, Oliveira 2013) e/ou populacionais como época reprodutiva, picos populacionais, deslocamentos, recrutamento e densidade, esclarecendo aspectos da dinâmica temporal do ciclo de transmissão (Boone et al.

1998, Mills et al. 1999, 2007, Yahnke et al. 2001, Suárez et al. 2003, Owen et al. 2010, Piudo et al. 2011, Vadell et al. 2011, Palma et al. 2012).

No Brasil, estudos com pequenos mamíferos têm elucidado muitos aspectos da ecologia de populações de roedores sigmodontíneos, em áreas de Mata Atlântica (Cerqueira et al. 1993, D'Andrea et al. 1999, 2007, Gentile et al. 2000, Feliciano et al. 2002, Bonecker et al. 2009, Antunes et al. 2010), e particularmente em áreas de Floresta Ombrófila Mista (Feliciano et al. 2002, Cademartori et al. 2004, 2005, Galiano et al. 2013). De maneira geral, a reprodução de muitas espécies de sigmodontíneos parece ocorrer de forma continuada ao longo de todo o ano nas regiões de Mata Atlântica, com picos em determinadas épocas. Em regiões do sul e sudeste do Brasil, estudos determinaram o pico das populações de algumas espécies de sigmodontíneos (como *Oligoryzomys nigripes*, *Akodon montensis* e *Akodon cursor*), ocorrendo nas épocas de junho-agosto, indicando um pico de atividade reprodutiva no final do verão (Gentile et al. 2000, Cademartori et al. 2004, Galiano et al. 2013). A redução da atividade reprodutiva no período de inverno está relacionada ao aumento de indivíduos jovens na população (aumento da população) (Fonseca & Kierulff 1989, Pereira et al. 1993, Gentile et al. 2000, Cademartori et al. 2004). A atividade reprodutiva continuada em regiões de Mata Atlântica é atribuída a estabilidade na disponibilidade de recursos e de habitats durante o ano (Fonseca & Kierulff 1989, Gentile et al. 2000).

A fauna de pequenos mamíferos do Estado do Paraná, em particular roedores sigmodontíneos, é bastante diversificada, tendo sido registradas aproximadamente 25 espécies deste grupo de roedores no Estado (Tiepolo 2007). Esta riqueza está relacionada ao fato de o Paraná possuir diferentes unidades de paisagem (Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional Semidecidual, Cerrado, Campos Gerais), em diferentes altitudes, algumas com espécies endêmicas ou ameaçadas (Boldrini 2009, Ribeiro & Vieira 2012). Particularmente, a fauna de mamíferos da região da Floresta Ombrófila Mista representa 24% do total de espécies de mamíferos do Brasil, apresentando uma alta riqueza de espécies considerando a sua extensão (Ribeiro & Vieira 2012).

Características gerais da biologia dos sigmodontíneos como rápida maturação sexual, curto período de gestação, grande tamanho das ninhadas e a ocorrência de estro pós-parto permitem que explosões populacionais ocorram em determinados períodos de oferta abundante e eventual de recursos, fenômeno conhecido como “ratada”. No Brasil, algumas ratadas foram relacionadas a ciclos sincronizados de floração e frutificação de espécies de taquaras (bambus) que podem ter intervalos com reprodução assexuada de até 30 anos aproximadamente (Jaksic & Lima 2003). Ao final do ciclo reprodutivo das taquaras e da

oferta extraordinária de sementes, as superpopulações de roedores acabam se deslocando e ocupando áreas peridomiciliares e rurais como plantações e depósitos de grãos (Oliveira 2013). Este fenômeno foi considerado como um dos possíveis fatores determinantes do primeiro surto de SPH ocorrido no Brasil, no município de Juitituba/SP (Silva et al. 1997).

Quanto aos estudos que associam dados populacionais dos roedores hospedeiros aos dados de infecção por hantavírus no Brasil, Oliveira (2012) teve como foco o monitoramento ao longo de 3 anos destas populações no município de Jaborá/SC, localizado na região de Floresta Ombrófila Mista de Santa Catarina. Foram determinados os padrões de flutuação populacional das principais espécies de roedores hospedeiros (*A. montensis* e *O. nigripes*) e a dinâmica da infecção por hantavírus ao longo de três anos. Ambas espécies apresentaram padrão de reprodução nos meses mais quentes e aumento dos tamanhos populacionais nos meses de inverno, entretanto *O. nigripes* apresentou maiores prevalências de infecção no período primavera-verão e *A. montensis* teve maiores prevalências na primavera (no primeiro ano do estudo) e no inverno (no último ano do estudo). Da mesma forma Limongi (2013), em estudo de um ano no Cerrado do município de Uberlândia, Minas Gerais, determinou maiores tamanhos populacionais no mês de agosto e maior prevalência no mês de novembro. Pereira et al. (2007) em estudo relacionado à vigilância epidemiológica em várias áreas de ocorrência de SPH no sul e sudeste do Brasil, observou maior prevalência de infecção em roedores machos adultos e com presença de cicatrizes, determinando maiores prevalências no inverno e verão para *N. lasiurus* (ARAV) e na primavera para *O. nigripes* (JUQV).

#### *Ecologia de comunidades, efeito diluidor e micro-habitat*

Além dos estudos populacionais, estudos de comunidades de roedores, comparando áreas com diferentes graus de preservação são importantes para se determinar os padrões de associação das espécies à diferentes paisagens e habitats (Mills et al. 1997, Calderón et al. 1999, Ruedas et al. 2004, Goodin et al. 2006, Armien et al. 2009, Voutilainen et al. 2012, Andreo et al. 2012). Alguns exemplos de áreas com diferentes gradientes de preservação são áreas de agricultura, bordas de remanescentes florestais e áreas de mata contínua, as quais podem representar diferentes situações eco-epidemiológicas em uma mesma região.

Alguns estudos reportam uma relação entre a infecção por hantavírus e a riqueza e abundância das espécies através do efeito diluidor, de modo que áreas com alta riqueza de espécies em geral apresentam menor prevalência de infecção nas espécies hospedeiras devido a uma maior pressão de competição (Mills 2006, Peixoto & Abramson 2006). Desta forma,



em situações de baixa diversidade de espécies há uma diminuição ou extinção de espécies competidoras ou predadoras (Terborgh et al. 2001, Mills 2006). Assim, a abundância dos hospedeiros de hantavírus (em geral, espécies de hábitos generalistas) tende a aumentar, aumentando assim a probabilidade de encontros intraespecíficos, conseqüentemente levando a uma maior probabilidade de transmissão (Tersago et al. 2008, Suzán et al. 2009, Clay et al. 2009, Dizney & Ruedas 2009, Dearing & Dizney 2010).

Outro aspecto importante dos estudos de roedores hospedeiros é a análise do habitat das espécies. Os padrões de ocupação do habitat estão associados à coexistência de espécies e a estruturação das comunidades, estando relacionados à ocorrência de competição interespecífica (Alho 2005). Além disso, a complexidade e a heterogeneidade do habitat podem influenciar diretamente na riqueza e abundância das espécies, de modo que ambientes mais complexos e heterogêneos podem oferecer uma maior variedade de habitats potenciais do que ambientes mais simples (Fahrig & Paloheimo 1988, Gentile & Fernandez 1999).

A epidemiologia da SPH está portanto também relacionada à ecologia dos roedores hospedeiros, sendo as infecções por hantavírus associadas não somente a fatores populacionais e de comunidades, mas também a parâmetros climáticos e de micro-habitat.

## JUSTIFICATIVA

O Estado do Paraná é o quarto Estado do Brasil em número de casos de SPH e até o início deste estudo não havia sido realizado um levantamento abrangente das principais espécies de roedores hospedeiros no Estado e dos principais genótipos virais associados. Estas lacunas de conhecimento foram abordadas e os conhecimentos gerados estão apresentados no capítulo 1 e nos artigos em anexo.

Desta forma, a partir dos resultados apresentados no Capítulo 1 desta tese, foi direcionado um estudo temporal (2 anos) no município de General Carneiro, localizado na região da Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucárias), região que concentra a maioria dos casos de SPH do Estado. A Floresta com Araucárias vem sofrendo ações antropogênicas, tais como a introdução de espécies exóticas a partir do avanço de culturas de *Pinus* e construções de hidrelétricas (Boldrini, 2009). General Carneiro é o segundo município em número de casos no Estado (26 casos). Os casos de SPH em General Carneiro estão relacionados principalmente a trabalhadores rurais cujas atividades são o plantio e manejo de *Pinus elliotti* e *Pinus taeda*. Considerando que neste município a ocorrência de casos era constante desde o primeiro caso em 1999 até 2006, fica evidente a manutenção do ciclo silvestre pelos hospedeiros vertebrados nesta área e o risco potencial de infecção humana.

Os estudos prévios realizados neste município indicaram a ocorrência de infecções *spillover* além das associações esperadas vírus-hospedeiro, demonstrando que várias espécies participam do ciclo do hantavírus nesta região. Estudos temporais podem fornecer informações acerca da ecologia dos hospedeiros e padrões relacionados às flutuações nas suas taxas de infecção, de suma importância para a compreensão dos ciclos silvestres desta zoonose e determinantes para o risco da ocorrência de casos humanos.

Os dados gerados nesta tese são importante fonte de informação não só para a vigilância epidemiológica da SPH no Estado do Paraná, como também contribuem para a compreensão dos processos envolvidos na dinâmica dos ciclos silvestres de hantavírus, além de incrementar o conhecimento da fauna de pequenos mamíferos e sua ecologia.

## **OBJETIVOS GERAIS**

(1) Caracterizar a fauna de pequenos mamíferos e determinar suas taxas de infecção por hantavírus e os genótipos virais associados em quatro unidades de paisagem do Estado do Paraná

(2) Realizar um estudo das populações de roedores silvestres e de sua infecção por hantavírus, no município de General Carneiro/PR, considerando os parâmetros populacionais, as variáveis de habitat e a estrutura das comunidades, ao longo de dois anos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos descritos neste item se referem à metodologia geral, comum a todos os três capítulos da tese, e estão relacionadas aos procedimentos de captura de pequenos mamíferos e coleta de amostras, a saber: armadilhas e isca utilizadas, coleta de amostras para diagnóstico de infecção por hantavirus, coleta de dados bionômicos e reprodutivos, preservação de material testemunho, identificação taxonômica e diagnóstico de infecção por hantavírus.

### *Estudos de campo*

Em cada município foram estabelecidos entre 10 e 16 transectos, variando de 5 a 20 estações de captura. Em cada transecto foram utilizadas armadilhas de alumínio (modelo Sherman) média (7,62cm x 9,53cm x 30,48cm) e adicionalmente, armadilhas aramadas (modelo Tomahawk) de 40,64cm x 12,70cm x 12,70cm. Como isca foi utilizada uma pasta composta por uma mistura de paçoca de amendoim, banana, aveia e bacon.

Os animais capturados foram removidos dos transectos, para uma base laboratorial de campo. Como anestésico foi utilizado Dopalen<sup>®</sup> injetável (cloridrato de Ketamina), com dose de 60mg por quilo de massa corpórea, por via intramuscular, de acordo com orientação veterinária. Após a coleta de amostras de sangue para diagnóstico sorológico de infecção por hantavírus, os animais foram eutanasiados para coleta das seguintes amostras: medula do fêmur para confirmação taxonômica dos roedores por técnica citogenética; amostras de fígado preservadas em etanol e armazenadas a -20°C, para identificação taxonômica através de sequenciamento de DNA dos roedores infectados e posteriores estudos filogenéticos; e fragmentos de vísceras (rim, fígado, baço, pulmão e coração) armazenados criogenicamente, para confirmação da infecção viral por diagnóstico molecular.

Todos os animais foram pesados, medidos (corpo, cauda, pata e orelha) e verificados quanto ao sexo e atividade reprodutiva. A atividade reprodutiva foi constatada pela ocorrência de lactação e/ou gestação nas fêmeas de roedores, e pela presença de filhotes na bolsa dos marsupiais ou pelo intumescimento das tetas indicando presença de leite e desmame recente.

Todos os procedimentos de coleta de amostras, de dados biológicos e bionômicos foram realizados no laboratório de campo e utilizando-se equipamentos de proteção individual com nível de biossegurança 3 (jaleco, capuz fechado, traquéia para condução do ar, unidade turbo e filtro de ar motorizado de alta eficiência, para coleta de material biológico). As

expedições de coleta foram realizadas sob a Licença Permanente para coleta de material zoológico nº 13373 IBAMA/ICMBIO/SISBIO e seguem protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz, Licença nº L-049/08 CEUA-FIOCRUZ.

Todos os animais eutanasiados foram preservados em álcool 70% ou foram taxidermizados e seus esqueletos preparados para, ao término dos estudos, serem depositados como material testemunho na coleção científica zoológica do Museu Nacional, UFRJ.

### *Identificação Taxonômica*

A identificação taxonômica foi baseada inicialmente na morfologia externa. Desta forma, todos os espécimes coletados foram identificados em nível de gênero, sendo possível apenas para algumas espécies a identificação em nível específico. A identificação específica da maioria das espécies só é possível através da análise cariotípica por técnicas citogenéticas e, quando necessário, pela análise da morfologia craniana e técnicas moleculares.

A técnica de cariotipagem visa determinar o número cromossômico diplóide e fundamental, com objetivo de descrever e associar cada complemento cromossômico à espécie confirmando a identificação morfológica. A metodologia é aplicada segundo (Bonvicino 2011): As células em suspensão são obtidas por cultura de medula óssea por 2 horas a 37°C realizadas em campo com meio estéril previamente preparado em tubos de prolipropileno de 15 ml contendo RPMI1640 (80%), soro bovino fetal (20%), colchicina ( $10^{-6}$ M) e brometo de etídio (5ug/ml). Após incubação os tubos foram centrifugados por 5-10 minutos e re-suspendido em 10 ml de solução hipotônica fresca (KCl 0,075M). Após 30 minutos de hipotonização à temperatura ambiente uma fixação inicial foi feita adicionando 1 ml de Carnoy fresco (3 Metanol:1 Ácido Acético) na solução hipotônica, seguido de centrifugação por 5-10 minutos. O material foi então fixado em 10 ml de Carnoy para posterior processamento em laboratório. No laboratório, amostras das células em suspensão são preparadas em lâminas e coradas com Giemsa (4%) em tampão fosfato. Após a preparação das lâminas as imagens das metáfases são obtidas via microscópio óptico acoplado com câmara digital. Após a obtenção das fotografias das metáfases, os cariótipos são montados seguindo uma ordem decrescente de tamanho dos autossomos, sendo que os cromossomos sexuais são colocados a parte.

As análises morfológica e morfométrica do crânio foram utilizadas para diferenciar alguns espécimes do gênero *Akodon*, os quais não puderam ser identificados através do

cariótipo. A diferenciação foi feita com base na morfologia da dentição, morfometria da série molar e morfometria da menor largura do interorbital segundo Gonçalves et al. (2007) e Christoff et al. (2000). Os marsupiais *Gracilinanus* sp. e *Monodelphis dimidiata* foram identificados com base em Costa et al. (2003), Voss et al. (2005) e Creighton & Gardner (2008) para os espécimes de *Gracilinanus* sp. e com base em Pine & Handley (2008) e Vilela et al. (2010) para *Monodelphis dimidiata*.

A confirmação da identificação taxonômica através de análises moleculares foi realizada somente para as espécies infectadas. As amostras de DNA foram extraídas com um kit (Promega Wizard) seguindo o protocolo proposto pelo fabricante. As relações interespecíficas foram realizadas utilizando fragmentos de Citocromo *b* (cyt *b*) com aproximadamente 400 pares de base. A amplificação destes fragmentos foi realizada utilizando os iniciadores (*primers*) MVZ 05 (5'- CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT – 3') e MVZ 16 (5'- TAG GAA RTA TCA YTC TGG TTT RAT – 3') (Smith & Patton 1993). As amplificações por PCR foram realizadas em um volume final de 24 µl contendo de 20-80 ng de DNA, 0.2 µM de cada primer, 0.2 µM dNTP, 10x PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1.0 unidade de Taq DNA polimerase (GIBCO-BRL Life Sciences/Invitrogen®, Carlsbad, California). O ciclo do PCR começa por 1 minuto a 95°C; seguido por 10 ciclos de 1 minuto a 95°C (desnaturação), 1 minuto a 50°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão); 15 ciclos de 1 minuto a 95°C (desnaturação), 1 minuto a 48°C (anelamento) e 1:30 minutos a 72°C (extensão); e ainda 15 ciclos de 1 minuto a 95°C (desnaturação), 1 minuto a 45°C (anelamento) e 1:30 minutos a 72°C (extensão); e, finalmente 5 minutos a 75°C. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1%, foram purificados utilizando o kit GE Healthcare® (EUA), sendo quantificados no espectrofotômetro Nanodrop 1000c (Uniscience®). As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador ABI 377 (Applied Biosystems Inc.®). As seqüências foram visualizadas através de eletroferogramas, alinhadas através da ferramenta Clustal W no programa Mega 5.05 e então comparadas com seqüências depositadas no GenBank por meio da ferramenta Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Todas as identificações taxonômicas foram realizadas no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ, sob a supervisão do Dr. Paulo Sérgio D'Andrea e da Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino.

## *Diagnóstico de infecção por hantavirus*

O diagnóstico de infecção de todas as etapas desta tese (levantamento de espécies hospedeiras e estudo temporal) foi realizado no Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, IOC/FIOCRUZ, sob a coordenação da Dra Elba R. S. Lemos. As análises dos dois primeiros meses de coleta do estudo temporal (dezembro/2009 e março/2010), bem como as análises do levantamento de espécies nos outros municípios do Estado, foram também realizadas pelo Instituto Carlos Chagas - ICC/FIOCRUZ-PR, sob a coordenação da Dra Claudia Nunes Duarte dos Santos. A metodologia de diagnóstico realizada pelo ICC/FIOCRUZ está descrita nas publicações referentes ao capítulo 1 (Raboni et al. 2009b, 2012). A metodologia realizada no LHR/IOC/FIOCRUZ está descrita abaixo:

### *Análise sorológica*

A análise sorológica foi realizada através do ensaio imunoenzimático – ELISA - para detecção de anticorpos anti-hantavírus da classe IgG, utilizando o antígeno Araraquara fornecido pelo Prof. Dr Luiz Tadeu Figueiredo da USP/Ribeirão Preto, São Paulo (Figueiredo et al. 2009). Para realização do teste, placas de 96 poços foram sensibilizadas com proteína recombinante do nucleocapsídeo do hantavírus Araraquara (ARAV-N) na metade superior (linhas A, B, C e D) e extrato de *E. coli* usado como controle negativo na metade inferior (linhas E, F, G e H) diluídos em solução tampão carbonato-bicarbonato na concentração de 0,2µg/ µL, durante incubação por uma noite “overnight” a 4°C. Em seguida, após lavar a placa por 5 vezes com PBS pH 7.4 acrescido de Tween (PBS-T) 1X a 0,05%, foi adicionada solução de bloqueio ( leite em pó desnatado a 10% em PBS-T). Após incubação da placa a 37°C por duas horas e subsequente etapa de lavagem, as amostras de soro sabidamente positivas e negativas utilizadas como controle do teste, e as amostras em teste foram adicionadas na diluição de 1/400 em solução de bloqueio. Após nova incubação a 37°C por uma hora e etapa de lavagem por 6 vezes, anticorpos secundários anti-*Peromyscus leucopus* e anticorpos anti-*Rattus rattus* marcados com peroxidase foram utilizados como conjugado na diluição de 1/3000 em solução de bloqueio. Em continuação, após incubar e lavar novamente a placa, um substrato cromogênico (o-phenylenediamine = OPD) diluído em solução Citrato-Fostato (pH 4,9 a 5,2) foi adicionado acrescido de peróxido de hidrogênio e a placa então foi incubada por 15 a 20min a 37°C. Após o bloqueio da placa com adição de HCl a 1M, a absorbância foi mensurada a 490 nm em espectrofotômetro. A diluição do soro foi

considerada positiva quando a densidade ótica (DO) foi superior a 0,3. A DO final de cada diluição de soro foi calculada como a diferença entre o valor da DO mensurada nos poços sensibilizados com a proteína ARAV-N e aqueles sensibilizados com o antígeno controle negativo. Um título > 1: 400 foi considerado positivo.

#### *Extração do RNA viral*

As amostras de fragmentos de tecidos (pulmão, rim ou fígado) de roedores, previamente identificados como sororreativos, foram submetidas à extração do RNA viral pelo kit comercial PureLink™ (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante, descrito em seguida. Para a extração foram obtidos aproximadamente 50 mg de tecido que foram macerados com um pistilo em banho de nitrogênio líquido (NL), em uma primeira etapa. Em seguida foi adicionado 120µl de Trizol® (Invitrogen) no tubo e o tecido foi macerado complementarmente.

Posteriormente, 880µl de Trizol® foram adicionados e após homogeneização em vortex o material foi incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Na etapa seguinte 200µl de clorofórmio foram adicionados, o tubo agitado por 15 segundos e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000x g por 15 minutos a 4°C com a transferência em seguida de 400µl da fase aquosa para um novo tubo. Uma quantidade de 400µl de etanol a 70% foi adicionada e após homogeneização da amostra em vortex, o tubo foi invertido para dispensar qualquer precipitado. Subsequentemente 700µl da mistura foram transferidos para uma coluna com tubo coletor, submetidos à centrifugação a 12.000x g por 15 segundos à temperatura ambiente e o líquido do tubo coletor foi desprezado e a coluna recolocada no mesmo tubo coletor. Essas etapas foram repetidas a partir da adição de 700µl da mistura.

Em sequência, adicionou-se 700µl do tampão de lavagem I na coluna e centrifugou-se a 12.000x g por 15 segundos à temperatura ambiente, com o descarte do tubo coletor seguido pela colocação da coluna em um novo tubo coletor. Na etapa seguinte 500µl do tampão de lavagem II foram adicionados na coluna e submetidos à centrifugação a 12.000x g por 15 segundos a temperatura ambiente. O líquido do tubo coletor foi desprezado e a coluna foi recolocada no mesmo tubo coletor. Os passos foram repetidos a partir da adição de 500µl do tampão de lavagem II. Por fim as amostras foram centrifugadas a 12.000x g por um minuto à temperatura ambiente para secagem da membrana com RNA aderido, com posterior descarte do tubo coletor. A coluna foi colocada em um tubo de 1,5mL e adicionados 30µl de água livre



de nuclease, seguida da incubação à temperatura ambiente por um minuto e centrifugação da coluna com tubo de 1,5mL a 12.000x g por 2 minutos à temperatura ambiente. O RNA extraído foi aliquotado e armazenado no freezer -80°C.

#### *Transcrição Reversa do RNA (RT) com posterior Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)*

A partir do RNA total extraído foram realizadas a síntese e posterior amplificação do cDNA em uma única etapa (*One Step* PCR) com utilização do Mini Kit SuperScript III™ Reverse Transcriptase *One Step* (Invitrogen) e de *primers* específicos para o segmento S viral. Na PCR, tubos de 0,5 mL foram utilizados para preparar a solução contendo: 0,5 µl (100 pmol/µl) do *primer* H04-25F (5'- TAGTAGACTCCTTGAKAAGCT – 3'), 0,4 µl (100 pmol/µl) do *primer* H733-752R (5' – TCWATCCTTTCCATCCARTC – 3') (Guterres et al. 2013), 0,5 µl de SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase, 12,5 µl (0,4 mM de dNTP + 3,2 mM de MgSO<sub>4</sub>) de 2X Mix da reação, 8,9 µl de água nuclease-free e 0,2 µl (50mM) de Cloreto de Magnésio (MgSO<sub>4</sub>), com um volume total de 23 µl. Esta mistura era então distribuída em microtubos para PCR (0,2 mL) e então era acrescentados 2 µl de RNA da amostra, totalizando um volume final de 25 µl. Os tubos eram então alocados em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) que realizava uma primeira etapa de 48°C por 45 minutos para amplificação do cDNA, seguida de uma fase inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 51°C por 40 segundos, 68°C por 50 segundos, finalizando com uma etapa de extensão de 68°C por 5 minutos e uma temperatura final de 4°C.

Uma PCR Semi-Nested foi realizada para aumentar a sensibilidade da amplificação. Tubos de 0,5 mL foram utilizados para preparar a solução contendo: 0,25 µl (100 pmol/µl) do *primer* H274-791F (5'- CCACTTGATCCAACAGGG – 3'), 0,25 µl (100 pmol/µl) do *primer* H733-752R (5' – TCWATCCTTTCCATCCARTC – 3') (Raboni et al. 2005, Guterres et al. 2013), 0,1 µl (5U/µl) de Taq platinum DNA polimerase (Invitrogen), 0,25µl de dNTP (20mM), 2,5 µl de tampão PCR 10X, 0,75 µl (50mM) de Cloreto de Magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e 18,9 µl de água nuclease-free, com um volume total de 23 µl. Esta mistura era então distribuída em microtubos para PCR (0,2 mL) e então era acrescentado 2 µl do produto da primeira PCR da amostra, com um volume final de 25 µl. Os tubos eram então alocados em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) que realizava uma primeira etapa de 94°C por 2 minutos seguida por 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C

por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, uma extensão de 72°C por 5 minutos e uma temperatura final de 4°C.

#### *Análise de DNA em gel de agarose*

O gel de agarose a 1,5% foi preparado em tampão TBE 0,5X. Os produtos da PCR foram aplicados no gel e submetidos à eletroforese em tampão TBE 1X. A visualização do DNA foi realizada após o gel ter sido submetido ao banho de GelRed™ (Uniscience) durante 10 minutos, através da luz ultravioleta por meio de transluminador.

#### *Purificação e Sequenciamento nucleotídico*

Os DNAs obtidos foram purificados utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA), segundo o protocolo do fabricante. Os fragmentos obtidos na PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5%. As bandas de interesse foram excisadas dos géis, pesadas e transferidas para tubos de 1,5 mL. O tampão de solubilização (PROMEGA) foi adicionado a cada tubo na proporção de 10µl/10mg de gel e incubados a 65°C até estar completamente dissolvido.

A mistura foi então colocada na coluna disposta sobre os tubos coletores de 2,0 mL, incubados por um minuto à temperatura ambiente e centrifugados por um minuto a 16.000x g. Os filtrados foram descartados e, logo em seguida, adicionados 700µl de tampão de lavagem PROMEGA para remover todo resíduo da agarose, seguido de centrifugação por um minuto a 16.000x g e o filtrado descartado. Novamente 500µl de tampão de lavagem foram adicionados com subsequente centrifugação por 5 minutos a 16.000x g. Uma nova centrifugação de 1 minuto a 16.000x g foi realizada agora sem a tampa interna da centrífuga para total evaporação residual do etanol. As colunas foram transferidas para tubos de 1,5mL estéreis e identificados. Em uma nova etapa foram adicionados 50µl de água livre de nuclease (PROMEGA), seguida de incubação por um minuto à temperatura ambiente e centrifugação a 16.000x g por um minuto. A coluna foi descartada e o filtrado contendo o DNA a ser sequenciado foi estocado a -20°C.

O DNA purificado foi submetido ao sequenciamento utilizando o kit comercial BigDye® Terminator™ v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). O volume final de cada reação foi de 20µl, contendo: (i) DNA purificado a ser sequenciado, na concentração de 100-200ng; (ii) 3,2 pmol dos *primers* senso e antisenso (utilizado separadamente), (iii) 2µl

da mistura Big Dye terminator e (iv) 3µl de tampão fornecido pelo kit. O protocolo foi seguido, segundo o fabricante e a reação foi processada em um termociclador 9700 GeneAmp® sob as seguintes condições: 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. As sequências nucleotídicas foram obtidas em sequenciador automático, modelo ABI PRISM® 3130x (Applied Biosystems).

#### *Análise do sequenciamento*

As sequências de nucleotídeos e seus eletroferogramas de sequenciamento dos fragmentos amplificados do segmento genômico S foram analisados por meio do programa MEGA 5.0 (Tamura et al. 2011). Inicialmente as sequências foram analisadas contra o banco de dados depositado no GenBank utilizando a ferramenta BLASTn. Em seguida, as sequências obtidas foram manipuladas no programa MEGA 5.0. Após a localização dos iniciadores por meio dos quais o fragmento foi inicialmente amplificado, as sequências foram alinhadas entre si por meio da ferramenta MUSCLE (Edgar 2004) no programa MEGA 5.0. Uma sequência consenso foi estabelecida, e as divergências de nucleotídeos entre as sequências foram esclarecidas pela análise dos eletroferogramas de sequenciamento.

#### *Análise filogenética*

Para todas as análises filogenéticas realizadas, as sequências obtidas no sequenciamento e as obtidas em bancos de dados foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE (Edgar 2004) no programa Seaview4 (Gouy et al. 2010). As relações filogenéticas foram estimadas pelo método de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) implementado em MrBayes v3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003), usando o modelo GTR+G de substituição de nucleotídeos.

As configurações MCMC consistiam em duas corridas simultâneas independentes, com quatro cadeias cada, que foram executadas por 10 milhões de gerações e amostrados a cada 100 gerações, produzindo 100 mil árvores. Depois de eliminar 25% das amostras como “burn-in” uma árvore consenso foi construída. O suporte estatístico dos cladogramas foi medido pelo teste de razão de verossimilhança aproximada (Anisimova & Gascuel 2006) e as probabilidades posteriores bayesianas. Para as análises, sequências do vírus *Haantan* (NC005218) e o vírus *Seoul* (AY027040) foram utilizadas como grupo externo.

## **CAPÍTULO 1**

### **Levantamento de espécies de pequenos mamíferos e infecção por hantavírus em roedores silvestres no Estado do Paraná**

Este capítulo apresenta o levantamento de espécies de pequenos mamíferos em quatro unidades de paisagem, incluindo lista de espécies e taxas de infecção por hantavírus visando caracterizar a fauna de hospedeiros silvestres no Estado do Paraná. É discutida a ocorrência das espécies de pequenos mamíferos, considerando habitat e distribuição geográfica no Estado. Adicionalmente, são apresentados dois artigos científicos publicados durante o período de desenvolvimento desta tese, referentes à infecção por hantavírus em roedores silvestres no Estado do Paraná. Até o início deste projeto apenas estudos relacionados à infecção em humanos haviam sido publicados, portanto estas publicações contribuíram para o conhecimento sobre as espécies de roedores hospedeiros, bem como os genótipos virais associados, circulantes no Estado.

## **CAPÍTULO 1**

### **Levantamento de espécies de pequenos mamíferos e infecção por hantavírus em roedores silvestres no Estado do Paraná**

#### **OBJETIVOS**

Realizar um levantamento de espécies de pequenos mamíferos e determinar suas taxas de infecção por hantavírus e os genótipos virais associados em quatro unidades de paisagem do Estado do Paraná: Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual e Remanescentes de Cerrado.

#### **MATERIAL E MÉTODOS**

O levantamento de espécies de pequenos mamíferos e potenciais hospedeiras de hantavírus foi realizado em 7 municípios do Estado do Paraná, pertencentes a quatro unidades de paisagem do Estado (IBGE 2004) (Tabela 1.1, Figura 1.1):

- (1) Floresta Estacional Semidecidual, localizada no Norte/Oeste do Estado, também conhecida como *hylaea meridional*. Esta formação possui maior afinidade com o Cerrado do que com a Mata Atlântica (Tiepolo 2007);
- (2) Floresta Ombrófila Mista, localizada no Centro/Sul do Estado, distribuída por planaltos recobertos pela Floresta com Araucárias, representando a maior unidade de paisagem do estado, embora fragmentada naturalmente pelos Campos Gerais (Tiepolo 2007);
- (3) Floresta Ombrófila Densa, localizada na região litorânea. Também conhecida como Mares de Morros é o domínio das regiões serranas tropicais úmidas, incluindo a Serra do Mar (Tiepolo 2007);
- (4) Remanescentes de Cerrado, localizados no leste do Paraná, representados principalmente pelo Parque Estadual do Cerrado, uma das últimas áreas deste tipo de vegetação no Estado (Linsingen et al. 2006).

Tabela 1.1. Informações gerais sobre o levantamento de espécies de pequenos mamíferos no Estado do Paraná, com descrição das áreas de estudo.

Município de coleta	Período de Coleta	Unidade de Paisagem	Cobertura por remanescentes Florestais*	Casos de Hantavirose no município**	Esforço de Captura Total <sup>#</sup>
<b>General Carneiro</b>	Nov 2006 (Primavera)	FM	22%	24	1426 (5 noites)
<b>Paranaguá</b>	Dez 2007 (Final da Primavera)	FD	48%	1	1250 (5 noites)
<b>Itambaracá</b>	Out 2008 (Primavera)	FS	1%	-	1250 (5 noites)
<b>Jaguariaíva</b>	Jul 2009 (Inverno)	CE e outras	9%	-	1200 (5 noites)
<b>Curitiba/ Araucária</b>	Set 2009 (Final do Inverno)	FM	1-2%	1	460 (3 noites)
<b>Foz do Iguaçu</b>	Abr 2010 (Outono)	FS	22%	-	1075 (5 noites)

Obs: \*Segundo dados da Fundação SOS Mata Atlântica (SOSMA 2012); \*\*Até 2012 (fonte SESA-PR); <sup>#</sup>Armadilhas-Noite; FM=Floresta Ombrófila Mista, FD=Floresta Ombrófila Densa, FS=Floresta Estacional Semidecidual, CE=Remanescentes de Cerrado

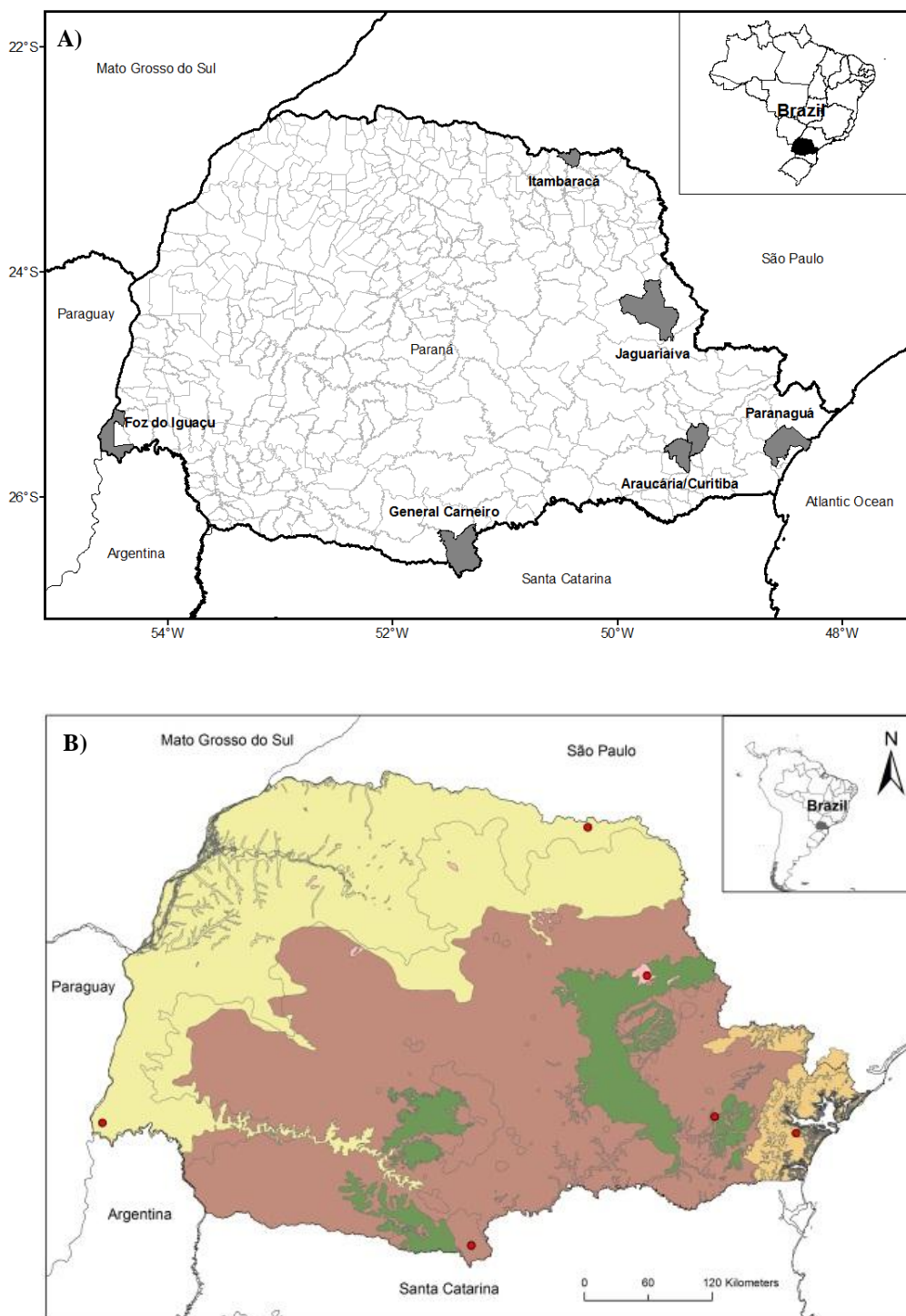


Figura 1.1. Localização dos municípios de coleta no estudo de levantamento de espécies hospedeiras de hantavírus de acordo com, A) Mapa político do Estado do Paraná (áreas de estudo em destaque); B) Principais unidades de paisagem do Estado do Paraná (Amarelo=Floresta Estacional Semidecidual; Marrom=Floresta Ombrófila Mista; Verde=Campos Gerais; Magenta=Remanescentes de Cerrado; Laranja= Floresta Ombrófila Densa)

A escolha dos municípios de coleta (General Carneiro, Paranaguá, Itambaracá, Jaguariaíva, Curitiba/Araucária e Foz do Iguaçu) seguiu demandas da Secretaria da Saúde do Estado do Paraná para realização de investigação sobre ocorrência de possíveis reservatórios de hantavírus em locais com notificação de casos humanos de SPH. Sempre que possível, a investigação era realizada logo após a notificação e parte das armadilhas eram dispostas próximas aos locais de provável infecção (LPI). Destes, apenas Foz do Iguaçu não foi posteriormente confirmado como sendo o município de infecção do paciente. Municípios sem casos de SPH registrados foram também investigados: Itambaracá por ser uma região com alto índice de fragmentação florestal e atividade humana relacionada à colheita e estocagem de grãos (atividade de risco de exposição), e Jaguariaíva por ser o último remanescente de Cerrado no Estado do Paraná (pesquisa de prospecção em área com potencial risco de transmissão).

Em General Carneiro (Figura 1.2) foram estudadas áreas nativas de Mata de Araucárias com presença de taquaras (1196 armadilhas-noite) (26°23'40.70"S 51°22'12.10"W), e áreas de divisa entre mata nativa degradada e plantações de *Pinus elliotti* e *Pinus taeda* (230 armadilhas-noite) (26°33'12.00"S 51°23'46.10"W). Em Paranaguá (Figura 1.3) todas as áreas de estudo eram semelhantes. Foram amostradas bordas de fragmentos de floresta (peridomicílios) conectados a uma área contínua nos arredores do Parque Nacional Saint Hilaire e da Área de Proteção Ambiental de Guaratuba (1250 armadilhas-noite) (25°34'34.80"S 48°38'0.20"W). Em Itambaracá (Figura 1.4) todas as áreas eram também semelhantes entre si e se caracterizavam como bordas de fragmentos florestais localizados em áreas peridomiciliares rurais, com alto grau de antropização e matriz representada por plantações de cana-de-açúcar e milho (1250 armadilhas-noite) (22°56'36.30"S 50°24'45.10"W). Em Foz do Iguaçu (Figura 1.5) foram amostradas áreas no Parque Nacional do Iguaçu (500 armadilhas-noite) (25°36'47.40"S 54°25'50.60"W), na zona de influência da Usina Hidrelétrica Itaipu Binacional (150 armadilhas-noite) (25°26'28.80"S 54°30'56.40"W) e em peridomicílios e borda de remanescentes florestais (425 armadilhas-noite) (25°28'32.90"S 54°31'9.70"W). Em Jaguariaíva (Figura 1.6), foram estudadas áreas remanescentes de Cerrado localizadas no Parque Estadual do Cerrado (PEC) (750 armadilhas-noite) (24°10'59.50"S 49°39'36.30"W) e fragmentos florestais (450 armadilhas-noite) na Fazenda Querência do Jerivá, localizada nos arredores do Parque. Estes fragmentos eram circundados por uma matriz de plantação de Sorgo (*Sorghum* sp.) e pastagens com presença de gado (24° 8'56.10"S 49°40'57.50"W), e estão localizados em uma região considerada de tensão ecológica com as regiões da Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional Semidecidual e Estepes Ombrófilas (Leite 2002, Tiepolo 2007). A coleta na zona metropolitana da capital (Figura 1.7) foi realizada em peridomicílio e borda de remanescentes de mata em uma área urbanizada de Curitiba (250 armadilhas-noite)



(25°34'56.20"S 49°20'34.00"W) e em uma área rural do município de Araucária, próximas a plantações de trigo (210 armadilhas-noite) (25°39'32.40"S 49°24'1.00"W).

De uma maneira geral, o desenho amostral buscou abranger principalmente áreas de borda de fragmentos florestais, áreas próximas a peridomicílios e/ou áreas de atividades rurais (Figura 1.8), pois é aonde se observa a ocorrência das principais espécies potenciais hospedeiras de hantavírus. Todas as áreas de estudo nos municípios de Itambaracá, Curitiba, Araucária e áreas fora de unidades de conservação em Foz do Iguaçu e Jaguariaíva possuíam este mesmo perfil. Áreas com um perfil diferenciado foram amostradas nas duas unidades de conservação estudadas, Parque Nacional do Iguaçu (PNI) e Parque Estadual do Cerrado (PEC), e nos municípios de General Carneiro e Paranaguá. Entretanto, destas, apenas o PNI configura uma área com alto grau de preservação. O PNI possui uma área de 185.262,20 ha (=1852,62 Km<sup>2</sup>) representando uma das últimas áreas preservadas da Floresta Atlântica do Alto do Paraná (cuja vegetação predominante é a Floresta Estacional Semidecidual). Já o PEC possui uma área de apenas 420,40 ha (=4,20 Km<sup>2</sup>), estando cercado por propriedades rurais que utilizam espécies exóticas, para fins agrícolas, pecuários e silviculturais. Foi ainda relatada a ocorrência de espécies invasoras como *Pinus* sp., *Eucalyptus* sp. e *Brachiaria* sp. na área do Parque (IAP 2002). General Carneiro é uma região de atividades relacionadas a silvicultura sem a presença de outros tipos de atividades (agricultura ou pecuária extensiva). Portanto a vegetação forma um mosaico de áreas de mata nativa de Araucárias e áreas de reflorestamento de *Pinus*. Paranaguá é o município de maior percentual de remanescentes florestais do Estado. As áreas estudadas, mesmo sendo bordas de floresta e peridomicílio estavam conectadas a uma área de vegetação contínua.

A riqueza de espécies foi quantificada pelo número total de espécies coletadas em cada unidade de paisagem. A prevalência da infecção foi calculada para cada espécie e sexo. Os roedores *Mus musculus* e *Rattus rattus* não foram incluídos nas análises por serem espécies sinantrópicas e por sua captura estar restrita ao intra e peridomicílio.

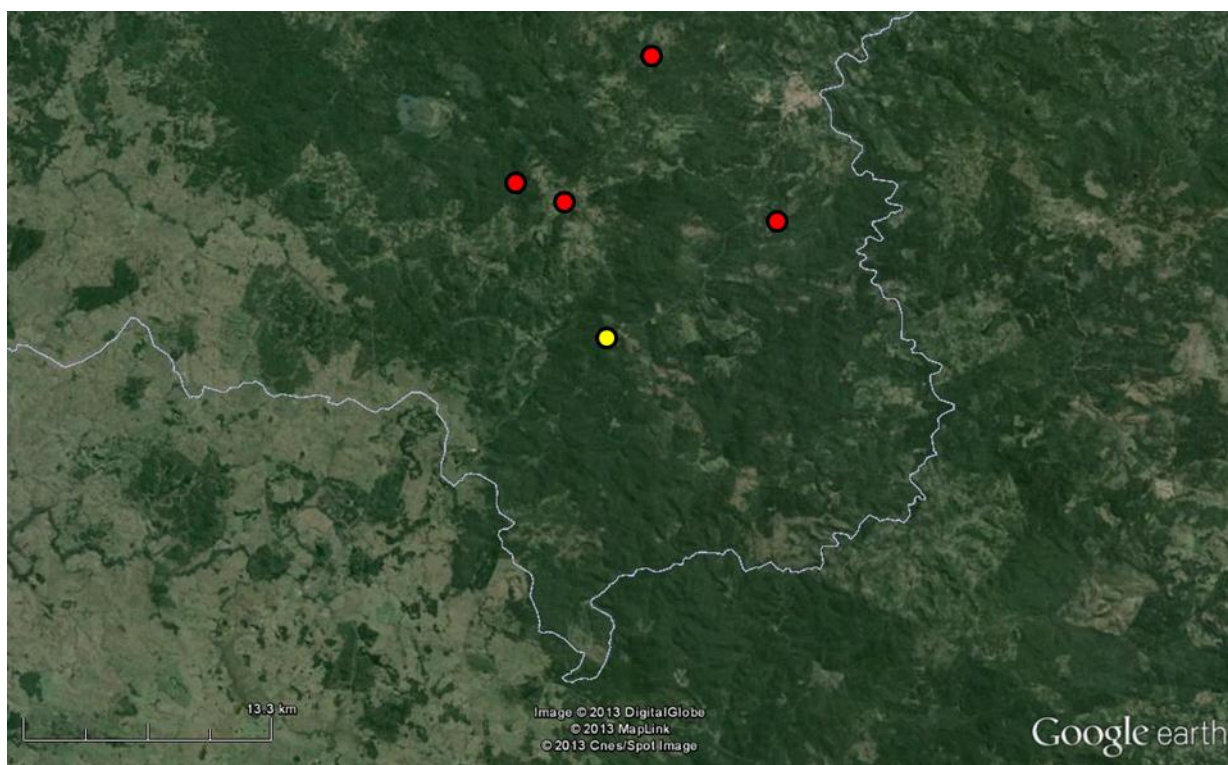


Figura 1.2. Áreas estudadas no município de General Carneiro/PR: áreas nativas de Mata de Araucárias (em vermelho) e divisa entre mata nativa degradada e áreas manejadas para plantio de Pinus (em amarelo). Imagem modificada do Google Earth<sup>®</sup>.

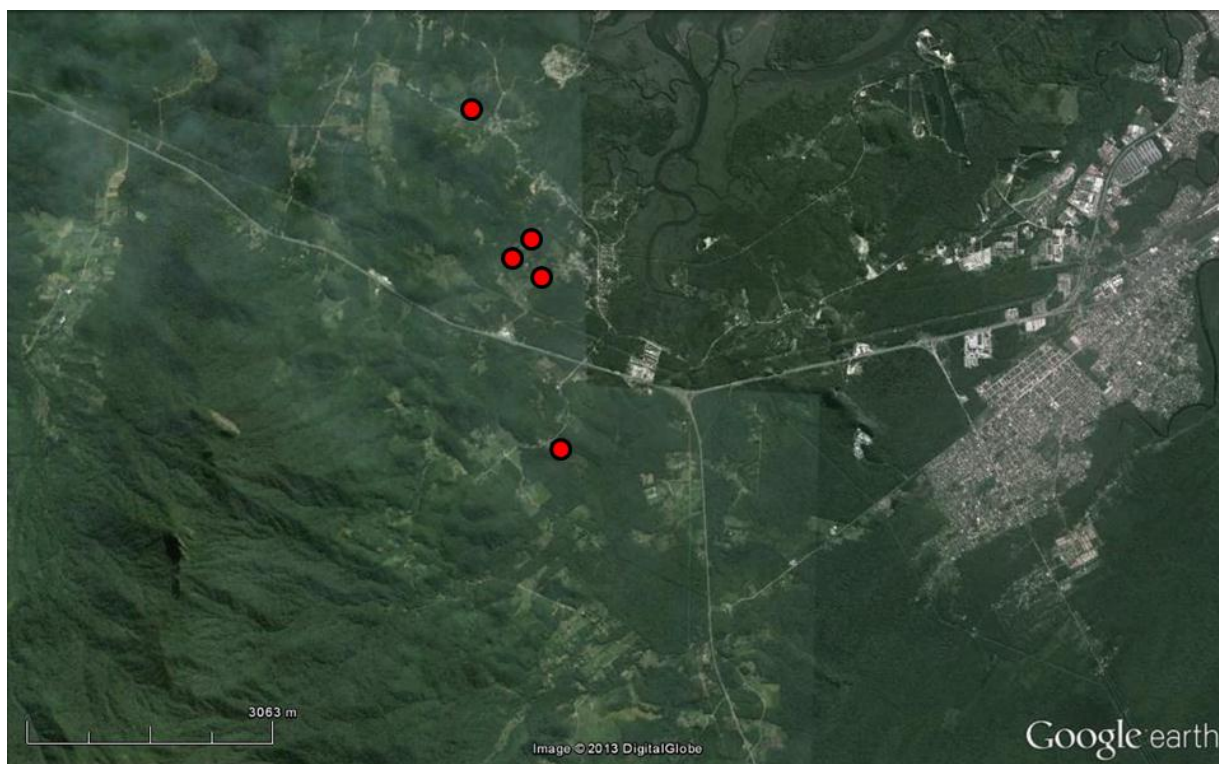


Figura 1.3. Áreas estudadas no município de Paranaguá/PR (em vermelho). Imagem modificada do Google Earth<sup>®</sup>.



Figura 1.4. Áreas estudadas no município de Itamaracá/PR (em vermelho). Imagem modificada do Google Earth®.



Figura 1.5. Áreas estudadas no município de Foz do Iguaçu/PR: áreas na zona urbana do município (em amarelo) e áreas do Parque Nacional do Iguaçu (em vermelho). Imagem modificada do Google Earth®.

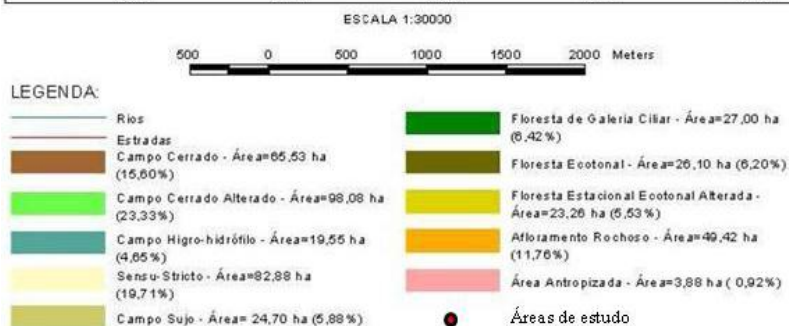
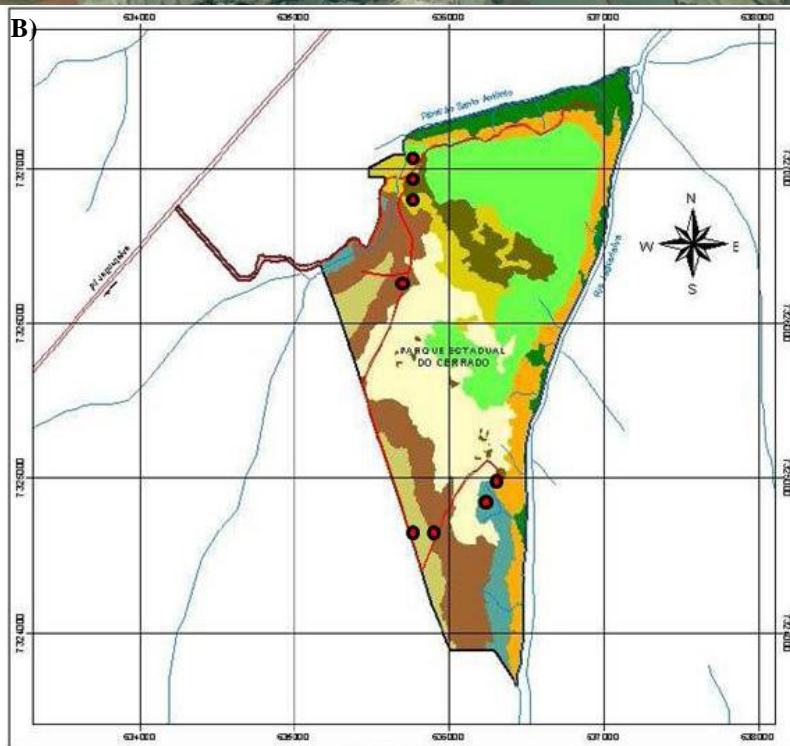
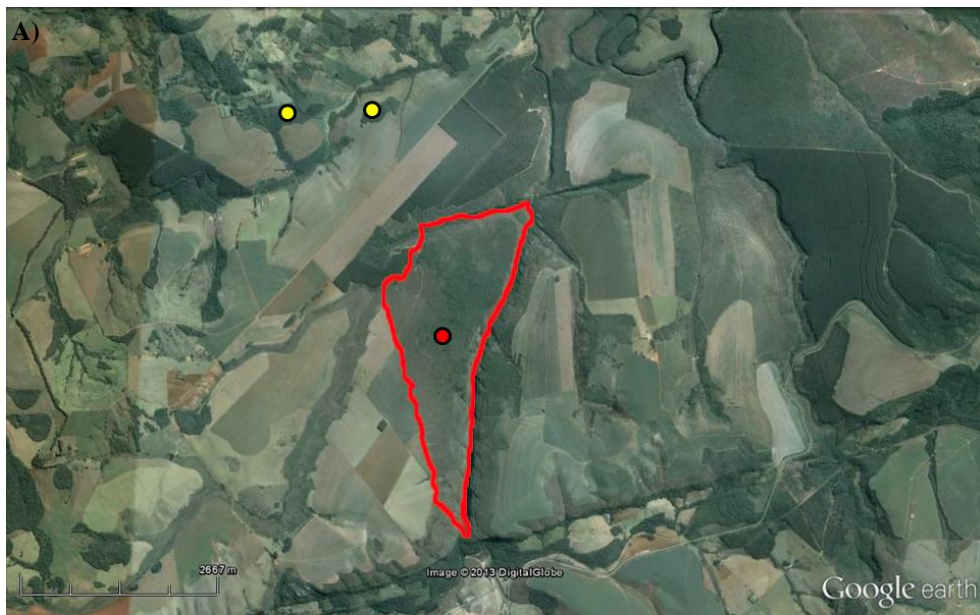


Figura 1.6. Áreas estudadas no município de Jaguariá/PR: (A) Fragmentos florestais (em amarelo) e Parque Estadual do Cerrado (PEC) (em vermelho). Imagem modificada do Google Earth®. (B) Áreas estudadas no PEC de acordo com o tipo de vegetação (em vermelho). Imagem modificada de IAP (2002).



Figura 1.7. Áreas estudadas na zona metropolitana da capital do Estado do Paraná: (A) Peridomicílio e borda de remanescentes florestal em uma área urbanizada de Curitiba (em vermelho). (B) Área rural do município de Araucária (em amarelo). Imagens modificadas do Google Earth®.

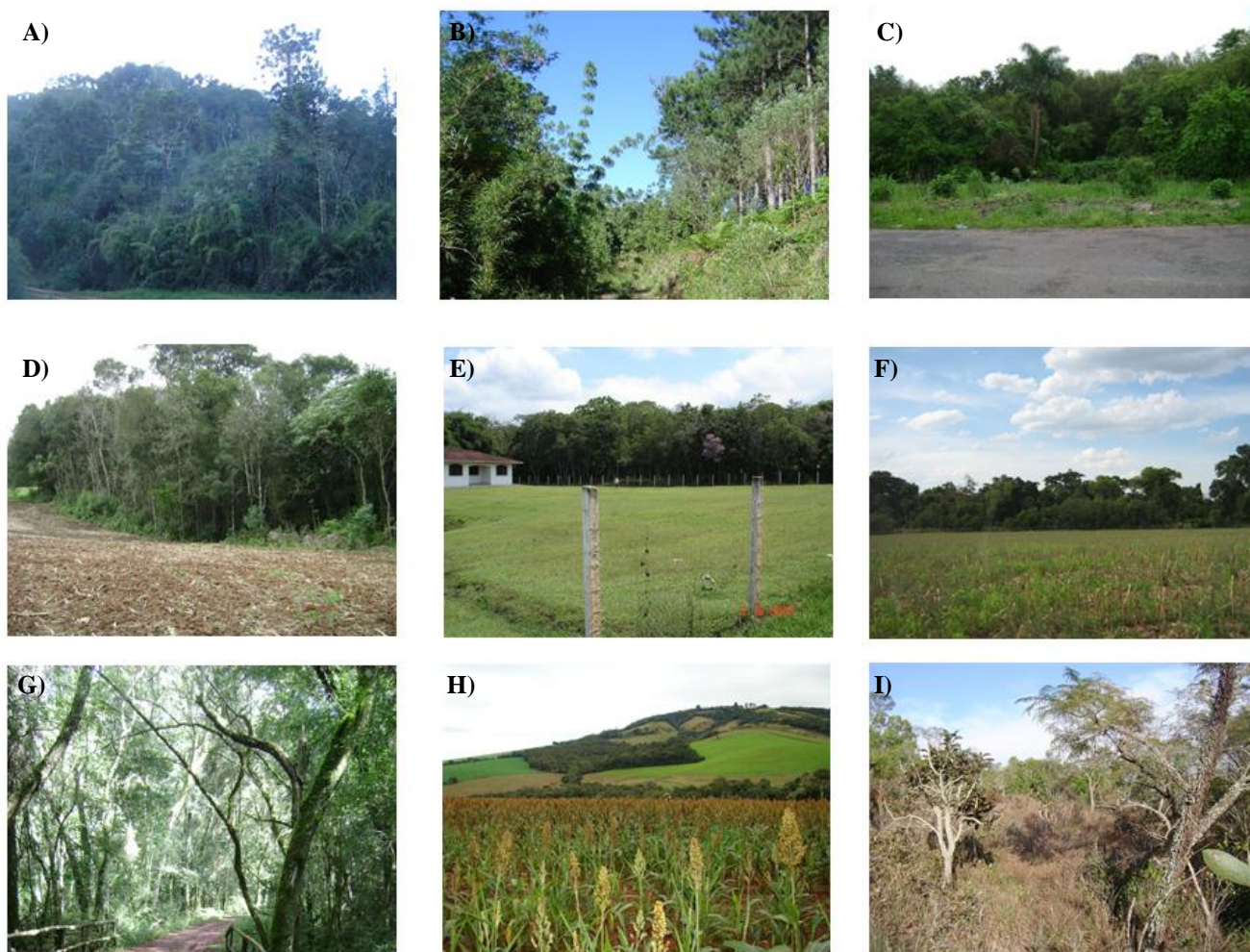


Figura 1.8. Aspecto geral das áreas estudadas: A) Mata de Araucárias, General Carneiro/PR; B) Divisa entre mata nativa degradada e plantação de Pinus, General Carneiro/PR; C) Fragmento florestal em área urbana, Curitiba/PR; D) Fragmento florestal em área rural, Araucária/PR; E) Área de Floresta Ombrófila Densa próxima a residência, Paranaguá/PR; F) Fragmento florestal em área rural, Itambaracá/PR; G) Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR; H) Fragmentos florestais em área rural, Jaguariaíva/PR; I) Parque Estadual do Cerrado, Jaguariaíva/PR.

## RESULTADOS

Foi coletado um total de 446 espécimes, resultando em uma riqueza total de 11 espécies de roedores sigmodontíneos, 2 espécies de roedores muríneos sinantrópicos e 3 espécies de marsupiais (Tabela 1.2, Figura 1.9). Deste total, 10 espécimes pertencentes a 3 espécies (*Oligoryzomys nigripes*, *Akodon montensis* e *Oxymycterus judex*) estavam infectadas por hantavírus, representando 2,43% de roedores infectados (sendo 3,08% de sigmodontíneos infectados). Todos os roedores infectados eram machos.

Tabela 1.2. Espécies de pequenos mamíferos coletadas no Estado do Paraná, de acordo com as unidades de paisagem estudadas: FM = Floresta Ombrófila Mista (municípios de General Carneiro, Curitiba e Araucária), FD = Floresta Ombrófila Densa (município de Paranaguá), Floresta Estacional Semidecidual (municípios de Itambaracá e Foz do Iguaçu), CE = Remanescentes de Cerrado (município de Jaguariaíva) e FJ = Fragmentos Florestais de Jaguariaíva

<b>Espécies</b>	<b>FM</b>	<b>FD</b>	<b>FS</b>	<b>CE</b>	<b>FJ</b>
<b>Rodentia: Sigmodontinae</b>					
<i>Akodon montensis</i>	50	25	76	1	20
<i>Akodon paranaensis</i>	16	-	-	-	-
<i>Akodon serrensis</i>	20	-	-	-	-
<i>Calomys tener</i>	-	-	-	12	-
<i>Euryoryzomys russatus</i>	-	4	-	-	8
<i>Nectomys squamipes</i>	-	8	-	-	-
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	22	18	15	2	4
<i>Oxymycterus judex</i>	2	-	-	-	-
<i>Oxymycterus</i> sp.	-	-	-	-	5
<i>Sooretamys angouya</i>	2	1	-	-	-
<i>Thaptomys nigrita</i>	3	9	2	-	-
<b>Rodentia: Murinae</b>					
<i>Mus musculus</i>	10	-	69	-	-
<i>Rattus rattus</i>	-	3	4	-	-
<b>Didelphimorphia: Didelphinae</b>					
<i>Didelphis aurita</i>	-	3	2	-	-
<i>Didelphis albiventris</i>	-	-	21	2	-
<i>Monodelphis dimidiata</i>	7	-	-	-	-
<b>Riqueza Sigmodontinae</b>	7	6	5	3	4
<b>Riqueza Didelphinae</b>	1	1	2	2	-
<b>Riqueza Total*</b>	8	7	7	5	4
<b>Prevalência <i>A. montensis</i></b>	4%	4%	1,04%	-	5%
<b>Prevalência <i>O. nigripes</i></b>	-	16,7%	15,8%	-	25%

\*Não foram incluídas as espécies sinantrópicas *M. musculus* e *R. rattus*.





*Floresta Ombrófila Mista (Municípios de General Carneiro, Curitiba e Araucária)*

Foi coletado um total de 132 espécimes, resultando em uma riqueza total nesta paisagem de 9 espécies: Rodentia, Sigmodontinae: 50 *Akodon montensis* (29M/21F), 20 *A. serrensis* (11M/9F), 16 *A. paranaensis* (7M/9F), 22 *Oligoryzomys nigripes* (10M/12F), 3 *Thaptomys nigrita* (3M), 2 *Sooretamys angouya* (2F) e 2 *Oxymycterus judex* (2M); Rodentia – Murinae: 10 *Mus musculus* (06M/04F); Didelphimorphia - Didelphidae: 7 *Monodelphis dimidiata* (7M).

As espécies mais abundantes foram: *Akodon montensis* e *O. nigripes*, representando 37,9% e 16,7% do total de espécimes capturados, respectivamente (Tabela 1.3) em um sucesso de captura total de 9,4%. Em General Carneiro não foi observado um padrão específico de associação das espécies encontradas com algum tipo de vegetação, já que todas as espécies ocorreram tanto nas áreas de mata nativa de Araucárias quanto na divisa entre mata nativa degradada e áreas manejadas para o plantio de Pinus. Na região metropolitana a espécie *Monodelphis dimidiata* ocorreu apenas nos remanescentes de mata de Curitiba enquanto que as outras espécies ocorreram tanto em Curitiba quanto no município de Araucária.

Tabela 1.3. Pequenos mamíferos coletados em áreas de Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucárias), nos municípios de General Carneiro, Curitiba e Araucária, Estado do Paraná

Espécies	General Carneiro		Região Metropolitana	
	Mata Nativa	Divisa Mata-Pinus	Remanescentes Urbanos	Remanescentes Rurais
<i>Akodon montensis</i>	27	4	7	12
<i>Akodon serrensis</i>	14	6	-	-
<i>Akodon paranaensis</i>	3	1	7	5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	2	5	6	9
<i>Thaptomys nigrita</i>	2	1	-	-
<i>Sooretamys angouya</i>	1	1	-	-
<i>Oxymycterus judex</i>	1	1	-	-
<i>Mus musculus</i>	-	-	3	7
<i>Monodelphis dimidiata</i>	2	1	4	-

Legenda: Mata Nativa e plantações de Pinus de General Carneiro = área extensa de mata de Araucárias entremeada por áreas de plantio de Pinus; Remanescentes urbanos = áreas peridomiciliares e borda de remanescentes de floresta em uma área urbanizada de Curitiba; Remanescentes rurais = áreas peridomiciliares e borda de remanescentes florestais em uma área com plantação de trigo do município de Araucária.

Foram observados 02 *Akodon montensis* e 01 *Oxymycterus judex* sororeativos e com confirmação pela RT-PCR, todos na região de General Carneiro, representando 2,6% do total de roedores sigmodontíneos. As análises de sequenciamento genético indicaram que um *A. montensis* e um *O. judex* apresentaram infecção pelo vírus Juquitiba (JUQV) enquanto que o outro *A. montensis* apresentou infecção pelo vírus Jaborá (JABV). Um *A. montensis* infectado foi capturado na divisa entre mata nativa degradada e área de Pinus, enquanto que os outros 2 roedores foram capturados nas áreas de Mata de Araucárias. Todos os roedores infectados eram machos escrotados, não apresentando cicatrizes na pele do animal. Nenhum dos roedores capturado na região metropolitana apresentou infecção por hantavírus.

#### *Floresta Ombrófila Densa (Município de Paranaguá)*

Foi coletado um total de 71 espécimes, resultando em uma riqueza total de 08 espécies: Rodentia – Sigmodontinae: 25 *Akodon montensis*, 18 *Oligoryzomys nigripes*, 09 *Thaptomys nigrita*, 04 *Euryoryzomys russatus*, 08 *Nectomys squamipes* e 01 *Sooretamys angouya*; Rodentia – Murinae: 03 *Rattus rattus*; e Didelphimorphia - Didelphidae: 03 *Didelphis aurita*.

As espécies mais abundantes foram *Akodon montensis* e *Oligoryzomys nigripes* representando 36% e 25% do total de espécimes capturados, respectivamente em um sucesso de captura total de 5,7%.

Três espécimes de *Oligoryzomys nigripes* e 01 *Akodon montensis* apresentaram sorologia reativa para infecção por hantavírus, representando 5,9% do total de roedores sigmodontíneos capturados. Dois *O. nigripes* apresentaram confirmação da infecção pela RT-PCR, tendo sido confirmada infecção por JUQV em ambos espécimes. Os outros dois espécimes soropositivos (um *O. nigripes* e um *A. montensis*) não apresentaram confirmação de infecção pela RT-PCR. Todos os roedores infectados eram machos escrotados, sendo que 02 *O. nigripes* e 01 *A. montensis* apresentaram cicatrizes.

#### *Floresta Estacional Semidecidual (Municípios de Itambaracá e Foz do Iguaçu)*

Foi coletado um total de 189 espécimes, resultando em uma riqueza total de 7 espécies: Rodentia – Sigmodontinae: 75 *Akodon montensis* (42M/33F), 12 *Oligoryzomys nigripes* (9M/6F) e 3 *Thaptomys nigrita* (1M/2F); Rodentia – Murinae: 69 *Mus musculus* (44M/25F), 04 *Rattus rattus*

(2M/2F); e Didelphimorphia - Didelphidae: 02 *Didelphis aurita* (2F) e 21 *Didelphis albiventris* (7M/14F).

As espécies mais abundantes foram *Akodon montensis* e o roedor sinantrópico *Mus musculus* representando 39,7% e 36,5% do total de espécimes capturados, respectivamente (Tabela 1.4), em um sucesso de captura total de 8,1%. As espécies *T. nigrita* e *D. aurita* ocorreram apenas na área preservada (Parque Nacional do Iguaçu) enquanto que *D. albiventris* e o roedor sinantrópico *M. musculus* ocorreram apenas na zona rural do município de Foz do Iguaçu e nos fragmentos florestais de Itambaracá. Não foi capturado nenhum pequeno mamífero na área de influência da Usina Hidrelétrica Itaipu Binacional.

Tabela 1.4. Pequenos mamíferos coletados em áreas de Floresta Estacional Semidecidual, nos municípios de Itambaracá e Foz do Iguaçu, Estado do Paraná

<b>Espécies</b>	<b>Fragmentos Florestais de Itambaracá</b>	<b>Parque Nacional do Iguaçu</b>	<b>Zona Rural de Foz do Iguaçu</b>
<i>Akodon montensis</i>	13	29	33
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	12	2	1
<i>Thaptomys nigrita</i>	-	3	-
<i>Mus musculus</i>	25	-	44
<i>Rattus rattus</i>	4	-	-
<i>Didelphis aurita</i>	-	2	-
<i>Didelphis albiventris</i>	20	-	1

Legenda: Fragmentos florestais de Itambaracá = borda de remanescentes florestais em área rural, com plantação de milho e cana-de-açúcar; Parque Nacional do Iguaçu = área contínua preservada; Zona rural de Foz do Iguaçu = peridomicílios e borda de remanescentes de floresta em uma área urbanizada

Apenas um espécime de *O. nigripes*, proveniente de Itambaracá, apresentou sorologia reativa para infecção por hantavírus e confirmação pela RT-PCR, representando 1,1% do total de roedores sigmodontíneos. Foi confirmada infecção por JUQV, sendo que o roedor infectado era um macho escrotado. Nenhum dos roedores capturados nas duas áreas do município de Foz do Iguaçu apresentou infecção por hantavírus.

*Remanescentes de Cerrado e Fragmentos Florestais (Município de Jaguariaíva)*

Foi capturado um total de 54 espécimes de pequenos mamíferos, pertencentes as seguintes espécies: Rodentia – Sigmodontinae: 21 *Akodon montensis* (13M/08F), 12 *Calomys tener* (07M/05F), 06 *Oligoryzomys nigripes* (4M/2F), 08 *Euryoryzomys russatus* (4M/4F), 05 *Oxymycterus* sp. (4M/1F), e Didelphimorphia - Didelphidae: 02 *Didelphis albiventris* (2F).

As espécies mais abundantes foram *Akodon montensis* e *Calomys tener* representando 39% e 22% do total de espécimes capturados, respectivamente (Tabela 1.5). Observou-se um sucesso total de captura de 4,5%. Em relação aos tipos de vegetação presentes na área de estudo, *A. montensis*, *O. nigripes*, *Oxymycterus* sp. e *E. russatus*, ocorreram apenas em fragmentos florestais. *Calomys tener* e o marsupial *D. albiventris* ocorreram apenas em vegetação de Campo Cerrado e Campo Sujo presentes no Parque Estadual do Cerrado.

Tabela 1.5. Pequenos mamíferos coletados no Parque Estadual do Cerrado e em fragmentos florestais nos arredores, no município de Jaguariaíva, Estado do Paraná

Espécies	Parque Estadual	
	do Cerrado	Fragmentos Florestais de Jaguariaíva
<i>Akodon montensis</i>	01	20
<i>Calomys tener</i>	12	-
<i>Euryoryzomys russatus</i>	-	08
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	02	04
<i>Oxymycterus</i> sp.	-	05
<i>Didelphis albiventris</i>	02	-

Legenda: Parque Estadual do Cerrado = unidade de conservação com presença de Cerrado relictual; Fragmentos florestais de Jaguariaíva = remanescentes de mata em área de tensão ecológica com influência de características de três unidades de paisagem diferentes

Foi diagnosticada infecção por JABV em um espécime de *A. montensis* e por JUQV em um espécime de *O. nigripes*. Os dois espécimes infectados ocorreram na área de fragmentos florestais. Ambos indivíduos infectados eram machos com cicatrizes, entretanto apenas o espécime de *O. nigripes* era escrotado.

## DISCUSSÃO

### *Riqueza e composição de espécies das áreas estudadas no Estado do Paraná*

A riqueza total de espécies capturadas (11 roedores e 4 marsupiais) foi baixa considerando a extensão e abrangência deste estudo (realizado em 7 municípios, distribuídos por 4 unidades de paisagem do Estado). Em sua maioria as espécies encontradas são as de ocorrência mais frequente no Estado do Paraná (Tiepolo 2007). Em seu trabalho de revisão Tiepolo (2007) apresenta 25 espécies de roedores sigmodontíneos de ocorrência para o Estado.

A composição de espécies encontrada pode estar relacionada ao fato de a maioria das áreas estudadas serem locais aonde se observa frequentemente maior abundância de algumas espécies de hábitos generalistas (*A. montensis*, *O. nigripes*, *O. judex*, *D. aurita*, *D. albiventris*) e ocorrência eventual ou menos abundante de espécies de habitat restrito ou relacionadas à áreas com maior grau de conservação. Desta forma, espécies de ocorrência esperada em algumas destas unidades de paisagem não foram capturadas, como os roedores *Akodon cursor*, *Oligoryzomys flavescens*, *Delomys sublineatus*, *Holochilus brasiliensis*, *Hylaeamys megacephalus*, *Juliomys pictipes*, *Scapteromys* sp., *Wilfredomys oenax*, além de 6 espécies do gênero *Oxymycterus* (*O. quaestor*, *O. nasutus*, *O. dasythrichus*, *O. delator*, *O. misionalis*, *O. nasutus*) e os marsupiais *Gracilinanus microtarsus*, *Marmosa paraguayana* e *Caluromys lanatus* (Dias & Mikich 2006, Tiepolo 2007, Vogel et al. 2010, Silveira 2012).

Outros fatores restritivos para a observação de uma maior riqueza de espécies podem ter sido o emprego de uma única técnica de amostragem (armadilhas "live trap" em solo) (Umetsu et al. 2006) e a realização de uma única coleta em cada município. De fato no estudo populacional realizado em General Carneiro (Capítulos 2 e 3 desta tese) a riqueza de espécies neste município aumentou de 8 para 14 espécies entre a coleta piloto realizada em 2006 e a última coleta realizada em 2011.

Todas as espécies capturadas eram esperadas para as regiões de estudo, com exceção de *A. montensis* para a qual observamos uma extensão da sua área de distribuição para a região norte do Estado (município de Itambaracá) (Bonvicino et al. 2008). Já a espécie *C. tener*, encontrada na região de Cerrado (município de Jaguariaíva), apesar de não apresentar registros publicados para o Estado do Paraná, foi reportada por Tiepolo (2007) e Carmignotto (2004) nesta mesma área de estudo. Para ambas espécies esta extensão de distribuição já era esperada uma vez que *A. montensis* é um roedor generalista que ocorre em toda a região de Mata Atlântica e *C. tener* um roedor típico de Cerrado (Bonvicino et al. 2003). As outras espécies de roedores apresentaram ocorrência de

acordo com a distribuição conhecida para o Estado (Bonvicino et al. 2008): *A. paranaensis* nas regiões Centro-Sul e Leste (FM e FD), *A. serrensis*, *S. angouya* e *T. nigrita* nas regiões Leste e Sul (FD e porção Sul da FM), *E. russatus* na porção Leste do Estado (FD e parte Leste da FS), *N. squamipes* (todo o Estado), *O. nigripes* nas regiões Centro-Sul e Leste (FM, FD e parte de FS) e *O. judex* (todo o Estado menos porção Norte).

#### *Unidades de Paisagem e Regiões Estudadas*

A maior riqueza de espécies foi observada na região de Floresta Ombrófila Mista (FM) (9 espécies). Entretanto, os municípios estudados desta região apresentaram resultados diferentes entre si. General Carneiro foi o município com maior riqueza de espécies de pequenos mamíferos neste estudo (8 espécies). Neste município não foi observada diferença na composição de espécies entre as áreas de mata nativa de Araucárias e as áreas de transição entre mata nativa degradada e reflorestamento de Pinus, já que as 8 espécies capturadas ocorreram em ambos os tipos de vegetação. Este resultado sugere que não há diferença na composição de espécies de pequenos mamíferos entre ambas áreas. A baixa riqueza de espécies e a fauna composta basicamente por espécies generalistas em Curitiba e Araucária foram resultados esperados devido à baixa porcentagem de remanescentes de Mata Atlântica nestes municípios (SOSMA 2012) e porque são áreas localizadas na região metropolitana da capital do Estado, portanto sob forte influência da urbanização.

As regiões de Floresta Ombrófila Densa (FD) e Floresta Estacional Semidecidual (FS) apresentaram igual riqueza de espécies (7 espécies cada). Entretanto, é válido ressaltar que em FS três municípios foram amostrados, enquanto que em FD apenas o município de Paranaguá foi estudado. Esta alta riqueza em apenas um município de FD pode estar relacionada ao fato de esta região apresentar alto percentual de remanescentes de Mata Atlântica em comparação com a região de FS (SOSMA 2012). De fato, ao analisarmos cada município de FS em separado observamos uma baixa riqueza de espécies em Itambaracá (3 espécies) e Foz do Iguaçu (5 espécies). Da mesma forma que os municípios de Curitiba e Araucária em FM, Itambaracá possui baixa porcentagem de remanescentes de Mata Atlântica (SOSMA 2012), o que pode explicar a baixa riqueza de espécies e a fauna composta basicamente por espécies generalistas. Já a riqueza de espécies em Foz do Iguaçu foi abaixo do esperado, principalmente nas áreas do Parque Nacional do Iguaçu (PNI) onde foram capturadas apenas 4 espécies sendo 3 consideradas de hábitos generalistas (*A. montensis*, *O. nigripes* e *D. aurita*), além de *T. nigrita*, espécie comum em outras regiões de Mata Atlântica. Entretanto, segundo o plano de manejo do PNI (IBAMA 1999) outras espécies são esperadas para a

área do Parque como os marsupiais *Didelphis albiventris* (capturado em nosso estudo em áreas peridomiciliares do município, fora do PNI) e *Caluromys lanatus*, e os roedores *Akodon serrensis*, *Holochilus brasiliensis*, *Nectomys squamipes* e *Oligoryzomys flavescens*. A baixa riqueza de espécies observada, em comparação com a lista disponível no plano de manejo, pode estar relacionada ao fato de a amostragem ter sido realizada apenas nas áreas mais próximas à sede do PNI (Figura 1.5). Áreas de mais difícil acesso e com menor influência de atividades de turismo não foram amostradas.

O município de Jaguariaíva apresentava tanto áreas de fragmentos florestais quanto áreas de remanescentes de Cerrado (Parque Estadual do Cerrado). Foi observada a ocorrência de 6 espécies de pequenos mamíferos sendo que 4 destas ocorreram no Parque Estadual do Cerrado (PEC). Dentre estas últimas, apenas *C. tener* é uma espécie típica deste bioma, sendo *D. albiventris* uma espécie de ocorrência em Caatinga, Cerrado e em Mata de Araucárias e as outras duas espécies, *A. montensis* e *O. nigripes* típicas de áreas de Mata Atlântica. Comparando-se os animais coletados neste estudo com a riqueza de espécies apontada no plano de manejo do PEC (IAP 2002), observa-se que *O. nigripes* e *D. albiventris* eram esperados para a região. A partir deste estudo, a espécie *A. montensis* foi descrita pela primeira vez para a área do Parque Estadual do Cerrado, aumentando a lista de espécies desta Unidade de Conservação. Outras espécies esperadas (IAP 2002, Tiepolo 2007) não foram capturadas como o marsupial *Gracilinanus agilis* e os roedores *Akodon serrensis*, *Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes*, *Oligoryzomys flavescens* e *Thaptomys nigrita*. Dentre estas, apenas as espécies do gênero *Calomys* e *N. lasiurus* podem ser consideradas espécies típicas do bioma Cerrado. A baixa riqueza de espécies típicas de Cerrado pode estar relacionada aos impactos decorrentes da pressão de atividades agrícolas no entorno do PEC ou ainda ao fato de estas áreas serem na verdade refúgios disjuntos de Cerrado relictual, remanescentes dos processos de retração pós-glacial (Straube 1998, Straube et al. 2005).

#### *Espécies Amostradas e Áreas de Ocorrência*

As espécies de roedores, *Akodon montensis* e *Oligoryzomys nigripes* ocorreram em todas as unidades de paisagem e em todas as diferentes áreas de estudo, desde ambientes silvestres com matas mais preservadas até áreas de bordas de mata e de interface entre o ambiente silvestre e o ambiente rural/peridomiciliar. Estas espécies são consideradas de hábitos generalistas (Dalmagro & Vieira 2005, Umetsu & Pardini 2007, Püttker et al. 2008, Goodin et al. 2009, Owen et al. 2010) e em geral ocorreram em altas abundâncias com exceção das áreas remanescentes de Cerrado onde suas abundâncias foram baixas.

A espécie *Thaptomys nigrita* também apresentou ampla distribuição ocorrendo em 3 municípios pertencentes a 3 unidades de paisagem diferentes (FM, FD e FS), desde áreas mais preservadas (mata nativa de General Carneiro, mata contínua de Paranaguá e PNI) até áreas alteradas (divisa entre mata nativa degradada e reflorestamento de Pinus). Entretanto em todas as áreas de estudo apresentou baixas abundâncias. Segundo Oliveira & Bonvicino (2011), *T. nigrita* pode ocorrer desde vegetação conservada a alterada, sendo muito comum em algumas áreas e rara ou pouco abundante em outras, dependendo da região de estudo. Umetsu & Pardini (2007), em estudo realizado em uma região de transição entre FD e FS no Estado de São Paulo observaram uma maior vulnerabilidade de *T. nigrita* a fragmentação florestal e Pardini et al. (2005) relacionaram a presença desta espécie a áreas mais preservadas e a interior de florestas maduras. Já Tiepolo (2007) encontrou esta espécie em áreas de vegetação secundária e em regeneração na FD do Paraná, ressaltando sua tolerância em ocupar ambientes antropizados, além de relacioná-la a eventos de “ratada” em uma área de FM no Estado do Paraná, que é a explosão populacional sincrônica à frutificação de taquaras.

Os roedores *Euryoryzomys russatus* e *Sooretamys angouya* e os marsupiais *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris* se distribuíram em mais de uma unidade de paisagem. *Euryoryzomys russatus* foi encontrado em FD e FJ (Paranaguá e em fragmentos florestais de Jaguariáiva, respectivamente), e *S. angouya* foi encontrado em FD e FM (Paranaguá e General Carneiro, respectivamente). As duas espécies apresentaram baixas abundâncias. As informações acerca da tolerância de *Euryoryzomys russatus* a alterações ambientais são controversas. Passamani & Fernandez (2011), estudando áreas fragmentadas em uma região de Mata Atlântica (Santa Teresa/ES), observaram tolerância de *E. russatus* à fragmentação florestal, uma vez que apresentou correlação negativa entre abundância e tamanho do fragmento. Entretanto outros estudos realizados em áreas fragmentadas e contínuas na Mata Atlântica do Estado de São Paulo observaram ser *E. russatus* uma espécie sensível à fragmentação florestal, sendo significativamente mais comum em áreas contínuas (Pardini et al. 2005, Umetsu & Pardini 2007, Naxara et al. 2009). *Sooretamys angouya* é uma espécie considerada comum mas não abundante (Bonvicino et al. 2002, Lima et al. 2010), sendo encontrada em fragmentos em estágio inicial de regeneração ou sujeitos a altos graus de alteração, apresentando entretanto, maiores abundâncias em fragmentos conectados a outros (Pardini et al. 2005, Umetsu & Pardini 2007).

As duas espécies do gênero *Didelphis* são reconhecidamente de hábitos generalistas, tolerantes a fragmentação e à áreas perturbadas, além de possuir a capacidade de atravessar diferentes tipos de matrizes (Fonseca & Kierulff 1989, Passamani & Ribeiro 2009, Passamani & Fernandez 2011). Em nosso estudo ambas ocorreram em áreas de peridomicílio e bordas de



fragmentos florestais embora *D. aurita* tenha sido encontrado também no Parque Nacional do Iguaçu.

*Akodon paranaensis* e o marsupial *M. dimidiata*, apesar de ocorrerem em mais de uma região de estudo, eram restritas a uma mesma unidade de paisagem (FM), tendo sido encontrados tanto em áreas de mata nativa em General Carneiro, quanto em áreas modificadas (divisa mata nativa degradada/Pinus em General Carneiro, área urbana de Curitiba e fragmentos florestais do município de Araucária). De fato em outros estudos, *Akodon paranaensis* foi encontrada tanto em áreas preservadas de mata nativa (Pedó et al. 2010) quanto em áreas arbustivas de campos não cultivados, sendo muito abundante nesta última (Scheibler & Christoff 2007). Da mesma forma, o marsupial *M. dimidiata* foi encontrado por outros autores tanto em áreas nativas de Campos Gerais (Pedó et al. 2010, Baladrón et al. 2012) quanto em áreas fragmentadas na Mata Atlântica do Estado de São Paulo (Püttker et al. 2012).

Todas as outras espécies apresentaram distribuição restrita a apenas uma região de estudo. Os roedores *Akodon serrensis* e *Oxymycterus judex* ocorreram tanto nas áreas nativas de Araucárias quanto na divisa entre mata nativa degradada e áreas de silvicultura em General Carneiro, sendo que apenas *A. serrensis* apresentou altas abundâncias. A restrição de *Akodon serrensis* a esta região está associada ao fato de esta espécie ocorrer principalmente em regiões de maior altitude (Olifiers et al. 2007, Tiepolo 2007). *Oxymycterus judex* é uma espécie encontrada em áreas de florestas, mas principalmente em áreas impactadas como bordas de fragmentos, áreas abertas de agricultura e áreas de vegetação alterada (Silva 2001, Graipel et al. 2006, Vaz et al. 2007, Rossi 2011).

*Calomys tener* e *Oxymycterus* sp. ocorreram apenas na região de Jaguariaíva, sendo que a primeira nas áreas de Cerrado do PEC e a segunda nos fragmentos florestais. *Calomys tener* é uma espécie típica de Cerrado podendo ocorrer também em áreas abertas de Floresta Estacional Semidecidual (Umetsu & Pardini 2007, Martin et al. 2012). Possui hábitos generalistas e na Mata Atlântica ocorre principalmente em áreas alteradas como pastagens, áreas de agricultura, áreas de silvicultura em estágios iniciais de crescimento, além de áreas rurais próximas a habitações humanas (Bonvicino et al. 2002, Umetsu & Pardini 2007, Gheler-Costa et al. 2012, Martin et al. 2012). Além disso, é usada como espécie indicadora de ambientes alterados em áreas perturbadas e afetadas por fogo (Briani et al. 2004, Henriques et al. 2006).

*Nectomys squamipes* foi encontrado somente em FD (Paranaguá). É uma espécie de hábitos semi-aquáticos, sendo geralmente encontrada próxima a cursos d'água (D'Andrea et al. 2007, Gentile et al. 2010). Em nosso estudo *N. squamipes* foi capturado em áreas com e sem a presença de cursos d'água. Possui ampla distribuição geográfica ocorrendo em vegetação alterada e conservada ao longo de sua distribuição (Bonvicino et al. 2002, Oliveira & Bonvicino 2011).

Os resultados da infecção por hantavírus nos roedores citados acima foram publicados em Raboni et al. (2009b) e Raboni et al. (2012), artigos que fazem parte dos resultados deste capítulo.

As espécies *A. montensis* e *O. nigripes* são as principais espécies hospedeiras de hantavírus no Estado do Paraná, considerando que 9 espécimes destas duas espécies foram encontradas infectadas (*Akodon montensis*/JABV e *Oligoryzomys nigripes*/JUQV). *A. montensis* e *O. nigripes* são espécies de hábitos generalistas, sendo muitas vezes encontradas próximas de habitações humanas (Suzuki et al. 2004), o que reforça sua importância na transmissão de SPH. O fato de terem sido observadas infectadas em diferentes ambientes demonstra que o ciclo de transmissão de hantavírus entre os roedores ocorre independente do grau de conservação da área ou mesmo da unidade de paisagem. Assim, o comportamento de risco humano, por exemplo, tipo de atividade laboral, é um fator determinante para a ocorrência da transmissão dos hantavírus dos roedores para o homem.

Em relação às outras espécies capturadas, apenas um indivíduo de *Oxymycterus judex* foi encontrado infectado por JUQV, no município de General Carneiro. Esta infecção caracteriza um *spillover* já que *O. nigripes* é considerado o hospedeiro primário deste genótipo viral. A caracterização de *O. nigripes* como hospedeiro primário não se deve apenas ao fato desta espécie ter sido a primeira descrita como hospedeira de JUQV (Suzuki et al. 2004). Outras características ecológicas importantes podem confirmar esta hipótese, como a abrangência geográfica desta associação, sendo esta espécie encontrada infectada em diversas regiões de Mata Atlântica (Suzuki et al. 2004, Pereira et al. 2007, Oliveira et al. 2009), ou ainda seu caráter temporal, sendo *O. nigripes* encontrado infectado por JUQV ao longo do ano (Oliveira 2012). No município de General Carneiro outra associação do tipo *spillover* ocorreu, tendo sido encontrado um espécime de *A. montensis* também infectado por JUQV. Da mesma forma, *A. montensis* pode ser considerado o hospedeiro primário de JABV, já que neste estudo identificamos esta associação em diversas regiões (Raboni et al. 2012), além de confirmarmos seu caráter temporal (ver capítulo 2).

Outras espécies observadas neste estudo como *S. angouya* e *C. tener* já foram reportadas com infecção por hantavírus em estudos anteriores. Em *S. angouya* foi reportada sororreatividade para hantavírus, entretanto sem confirmação molecular, na região de Jaborá/SC (Oliveira et al. 2011), e em *C. tener* foi reportada sororreatividade para hantavírus (Suzuki et al. 2004, Limongi et al. 2013) e confirmação de infecção *spillover* pelo Vírus Araraquara (ARAV) (Figueiredo et al. 2010) em áreas de Cerrado de São Paulo e Minas Gerais.

Ferimentos provenientes de encontros agonísticos são considerados a principal forma de transmissão de hantavírus entre os roedores, mais frequentemente observados em machos adultos (Glass et al. 1988, Boone et al. 1998, Yahnke et al. 2001, Mills et al. 2007, Piudo et al. 2011, Vadell et al. 2011). Neste estudo, todos os 10 animais encontrados infectados eram machos e 50% destes apresentavam cicatrizes, forma indireta de se determinar a ocorrência de encontros agonísticos. Dentre os 10 animais sororreativos, dois espécimes (um *O. nigripes* e um *A. montensis* provenientes de Paranaguá) não apresentaram confirmação de infecção através da RT-PCR.

A partir dos resultados gerados neste estudo observou-se um perfil diferenciado na relação específica hospedeiro-vírus, nas áreas de estudo do município de General Carneiro. Diferente das outras regiões, aonde aparentemente havia uma especificidade entre genótipo viral e espécie de roedor hospedeiro, em General Carneiro foi observada a ocorrência de *spillover* de JUQV em duas espécies (*A. montensis* e *O. judex*), diferentes do hospedeiro primário *O. nigripes*. Estes resultados motivaram o estabelecimento de novos objetivos para melhor compreensão do complexo ciclo de hantavírus nesta região, gerando um estudo de ecologia de populações e de comunidades de roedores hospedeiros (capítulos 2 e 3 desta tese).

Short  
Communication

## Phylogenetic characterization of hantaviruses from wild rodents and hantavirus pulmonary syndrome cases in the state of Paraná (southern Brazil)

Sonia Mara Raboni,<sup>1,2</sup> Federico G. Hoffmann,<sup>1</sup> Renata C. Oliveira,<sup>3</sup> Bernardo R. Teixeira,<sup>3</sup> Cibele R. Bonvicino,<sup>4</sup> Vanessa Stella,<sup>1</sup> Suzana Carstensen,<sup>1</sup> Juliano Bordignon,<sup>1</sup> Paulo S. D'Andrea,<sup>3</sup> Elba R. S. Lemos<sup>3</sup> and Claudia Nunes Duarte dos Santos<sup>1</sup>

## Correspondence

Claudia Nunes Duarte  
dos Santos  
clsantos@tecpar.br

<sup>1</sup>Instituto Carlos Chagas, ICC/Fiocruz/PR, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Paraná, Brazil

<sup>3</sup>Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>4</sup>Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

Over 1100 cases of hantavirus pulmonary syndrome (HPS) have occurred in Brazil since 1993, but little is known about Brazilian hantaviruses, and many of their rodent hosts remain unknown. The Araucaria hantavirus (ARAUV) was described recently from HPS patients from Paraná, in southern Brazil, but its host could not be identified. In this study, rodents were captured from regions with high HPS prevalence to address this issue. ARAUV RNA was detected in three distantly related rodent species: *Oligoryzomys nigripes*, *Oxymycterus judex* and *Akodon montensis*. Furthermore, a specimen of *A. montensis* was infected with a Jaborá-like virus, implying that *A. montensis* can be infected by at least two different hantaviruses. The presence of the same hantavirus strain in three different rodent species and the co-circulation of two different strains in the same rodent species highlight the potential for genomic reassortment, which could have an impact on hantavirus transmission dynamics in nature and on human epidemiology.

Received 6 March 2009

Accepted 10 May 2009

Hantaviruses belong to the genus *Hantavirus* in the family *Bunyaviridae* and are found throughout most of the world. Similar to other members of the family, hantaviruses are enveloped viruses with an RNA genome comprised of three negative-sense, single-stranded segments. The large (L) RNA segment encodes an RNA-dependent RNA polymerase, the medium (M) segment encodes two envelope glycoproteins – Gn and Gc – processed from one precursor, and the small (S) segment encodes the nucleocapsid protein (N) (Plyusnin *et al.*, 1996).

Hantaviruses use small mammals as vectors, and in the wild, most of the different hantaviruses have been found to associate predominantly with a specific rodent species that acts as the host in a given geographical region (Plyusnin & Morzunov, 2001). Although sporadic spillover between rodent species has been suggested (Childs *et al.*, 1994; Delfraro *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2008), conclusive evidence that the studied viruses can establish productive infections in more than one rodent host species is still missing.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences reported in this paper are FJ409556–FJ409561, FJ798975 and FJ798976.

Hantaviruses are transmitted to humans mainly through the inhalation of contaminated aerosols of rodent excreta (Lednicky, 2003; Schmaljohn & Patterson, 2001), but human-to-human transmission has also been described (Padula *et al.*, 1998). These viruses are associated with two clinical syndromes, haemorrhagic fever with renal syndrome, described in Europe and Asia with a mortality rate of 1–15%, and hantavirus pulmonary syndrome (HPS), described in the Americas with a mortality rate ranging from 40 to 60% (Lundkvist & Niklasson, 1994; Johnson *et al.*, 1999).

Despite the increasing incidence of HPS in Brazil (Elkhoury, 2005), little is known about the genetic diversity of its causative agents, Brazilian hantaviruses (Table 1), and identification of their rodent hosts remains incomplete. The south-western region of the state of Paraná (southern Brazil, 26° 07' S 51° 31' W) is one of the most heavily affected areas of Brazil, with a high number of HPS cases: 168 cases have been reported since 1993, 52 of which were fatal (Elkhoury, 2005). Two rodent species hosting hantavirus antibodies have been identified in the region: *Oligoryzomys nigripes* and *Akodon* sp. (Suzuki *et al.*, 2004). In addition, our group recently described the complete S

**Table 1.** Brazilian hantaviruses and their putative reservoirs

Hantavirus	Putative reservoir	Place of detection (Brazil)	Reference
Juquitiba-like virus	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Paraná and Santa Catarina	Suzuki <i>et al.</i> (2004)
Araraquara virus	<i>Necromys lasiurus</i>	São Paulo and Minas Gerais	Suzuki <i>et al.</i> (2004)
Castelo dos Sonhos	Unknown	Pará	Figueiredo <i>et al.</i> (2009)
Anajatuba virus	<i>Oligoryzomys fornesi</i>	Maranhão	Rosa <i>et al.</i> (2005)
Rio Mearin virus	<i>Holochilus sciureus</i>	Maranhão	Rosa <i>et al.</i> (2005)
Laguna Negra-like virus	<i>Calomys laucha</i>	Mato Grosso	Figueiredo <i>et al.</i> (2009)
Jabora virus	<i>Akodon montensis</i>	Santa Catarina	Padula <i>et al.</i> (2007)

sequence of a hantavirus termed Araucaria (ARAUV) isolated from HPS patients from Paraná state, and demonstrated that it is closely related to the *O. nigripes*-associated strains ITA37 and ITA38 from neighbouring Paraguay (Raboni *et al.*, 2005). Unfortunately, we were not able to identify the rodent species that was locally associated with ARAUV at the time or to characterize the other genomic fragments of ARAUV. The latter is important to permit comparison with viruses for which only sequences of the M segment are known, and to be able to detect genomic reassortment among the segments. The current study focused on elucidating the local rodent host of ARAUV and characterizing the M segment of the genome from viruses isolated in rodents and in human patients.

To identify the rodent species acting as host to ARAUV, we sampled rodents in Paraná and searched for the presence of ARAUV-like RNA in seropositive rodents. Collecting efforts were maximized in areas with reported HPS cases. Fieldwork was conducted in November 2006 and rodents were captured by using Tomahawk (40.6 × 12.7 × 12.7 cm) and Sherman (7.6 × 9.5 × 30.5 cm) live traps set in six sites (in rural and natural environments) in areas of HPS infection. Capture sessions were carried out in a total of 16 linear transects with 20 capture stations on each at 10 m intervals, for five nights, for a total of 1426 trap-nights for the whole study. The most abundant species were *Akodon montensis* and *Akodon serrensis* and the overall capture success was 5%. Six different genera and at least eight distinct species (seven rodent and one marsupial species) were recorded: *A. montensis* (31 specimens), *A. serrensis* (19), *Akodon paranaensis* (five), *O. nigripes* (seven), *Thaptomys nigrita* (three), *Oxymycterus (Oxy.) judex* (two), *Sooretamys angouya* (two) and two marsupials of the genus *Monodelphis*. Of the 69 captured rodent specimens from the subfamily Sigmodontinae, three had IgG antibodies against hantavirus (two specimens of *A. montensis* and one specimen of *Oxy. judex*).

All specimens were identified initially using external and cranial morphological analysis, and the identification of seropositive individuals was confirmed by karyological and molecular comparisons using the primers and conditions described by Delfraro *et al.* (2008). Seropositive animals were deposited as voucher specimens at the National Museum (MN), State of Rio de Janeiro; the remainder of

the specimens will be deposited once their taxonomic status is resolved.

Blood and tissue samples were obtained following standard field biosafety procedures (Mills *et al.*, 1995) and stored in liquid nitrogen for further processing. All blood samples were screened by enzyme immunoassay for hantavirus antibodies using both ARAUV (Raboni *et al.*, 2007) and Andes virus (ANDV) (Padula *et al.*, 2000) antigens. Viral RNA was extracted from the lungs and kidneys of seropositive rodents using TRIzol (Gibco) and submitted to RT-PCR to detect and amplify fragments of the viral genome. Amplicons for a fragment of the viral S segment were obtained using the primers and conditions described by Raboni *et al.* (2005). To complement the genetic characterization, we sequenced a rodent-derived M segment from the specimen with the highest quality viral RNA: the specimen of *Oxy. judex*. In addition to studies about the local hosts of ARAUV, we also improved on the genomic characterization of the viral strain responsible for the HPS cases in the vicinity where rodents were captured. We sequenced the complete M segment from one of these HPS patients (HRP/02-72) and partially sequenced the M segment of two patients from the same area (HPR/02-71 and HPR/03-97). For the human-derived viruses, viral RNA was extracted from blood samples of HPS patients using a high pure viral RNA kit (Roche Applied Science). cDNA corresponding to the complete M segment was synthesized using a specific primer and an ImProm-II reverse transcription system (Promega), following the manufacturer's protocol. The resulting cDNA was subjected to PCR. Two fragments, of 1679 and 2019 bp, were generated and these covered the complete M segment. In all cases, fragments were sequenced with BigDye3 (Applied Biosystems) using PCR primers (sequences available on request). The resulting chromatographs were verified visually using vector NTI software (Invitrogen).

The largest open reading frame of the 3417 nt M segment from patient HRP/02-72 encoded a glycoprotein precursor from nt 52 to 3468. The ARAUV Gn glycoprotein extended from aa 1 to 651 (nt 52–2004), including the conserved putative cleavage WAASA motif (aa 647–651), and the Gc glycoprotein extended from aa 652 to 1139 (nt 2005–3466). Five putative N-linked glycosylation sites at residues 138, 350, 402, 524 and 930 were predicted for ARAUV glycoprotein precursor as well as the three main O-

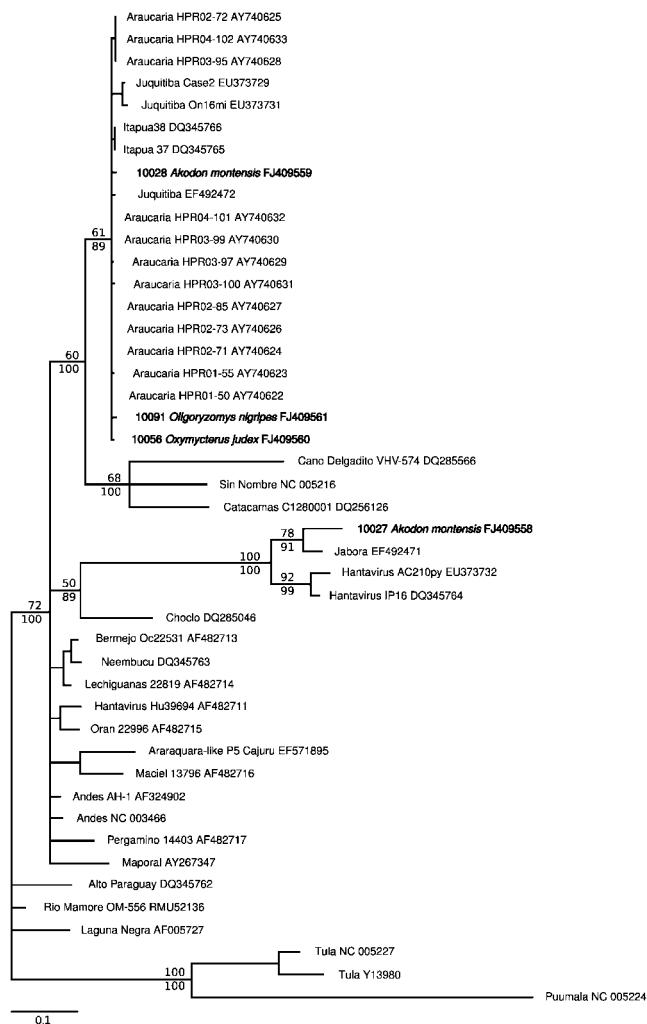
glycosylation clusters at residues 96, 306 and 582 (Tischler *et al.*, 2003).

In our study, we found two specimens of *A. montensis* (10027 and 10028) and one of *Oxy. judex* (10056) that were positive by enzyme immunoassay for ARAUV and ANDV hantavirus IgG antibodies and viral RNA, indicating that they were infected with hantavirus. The seropositive rodents were collected on different days in the same trapping period and on different transects of capture. The voucher numbers and capture coordinates of infected rodents were: MN 71600 (*A. montensis* 10027), which was captured in a mixed forest of pines and bamboos (26° 33' 12.0" S 51° 23' 46.1" W); MN 71601 (*A. montensis* 10028), which was captured in an area of forest regrowth (26° 24' 36.9" S 051° 23' 43.3" W); and MN 71602 (*Oxy. judex* 10056), which was captured in an area of primary forest with large trees (26° 28' 49.4" S 051° 19' 17.8" W). Nucleic acid extractions and PCR assays of seropositive rodents were performed in three independent laboratories with different unopened aliquots, and identical results were observed in all cases, thus confirming the findings.

To characterize the genetic diversity of the viral strains isolated in the state of Paraná and assess their phylogenetic relationships, we compared the obtained sequences to a reference panel that covered most hantavirus diversity from South America. Reference sequences were downloaded from public databases for the two segments used in this study (M and S). Bayesian estimations of phylogenies were conducted in MrBayes version 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), running four simultaneous chains for  $2 \times 10^6$  generations, sampling trees every 1000 generations and using default priors. We used a general time-reversible model of nucleotide substitution (Rodriguez *et al.*, 1990) in which rate variation followed a discrete gamma distribution. We assessed convergence by measuring the standard deviation of the split frequency among parallel chains. Chains were considered to have converged once the mean split frequency was lower than 0.01. We summarized the results with a majority-rule consensus of 1500 trees collected after convergence was reached; trees collected before chains reached convergence were discarded. Maximum-likelihood searches were conducted in Treefinder (October 2008 version; Jobb *et al.*, 2004), selecting the best-fitting model of nucleotide substitution using the Bayesian Information Criterion model selection routine in Treefinder. We evaluated support for the nodes with 1000 bootstrap pseudoreplicates.

In all sequence comparisons of the viral S segment, we included the sequence from a specimen of *O. nigripes* (10091) trapped in another region of Paraná state, as S segment sequences from the *O. nigripes*-associated ARAUV reported by Suzuki *et al.* (2004) do not overlap with the fragment used in this study. The viral strains isolated from *Oxy. judex* (10056), *O. nigripes* (10091) and *A. montensis* (10028) were all very similar (99% sequence identity in pairwise comparisons), and phylogenies based on the

partial S segment sequences (Fig. 1) indicated that they were all closely related to the other ARAUV sequences previously characterized from HPS patients (Raboni *et al.*, 2005) and to some recently reported Jucituba virus (JUQV)-like S segment sequences (Delfraro *et al.*, 2008). This result shows the epidemiological link between ARAUV from HPS patients and ARAUV found in the rodents, which was missing in our previous report (Raboni *et al.*, 2007).

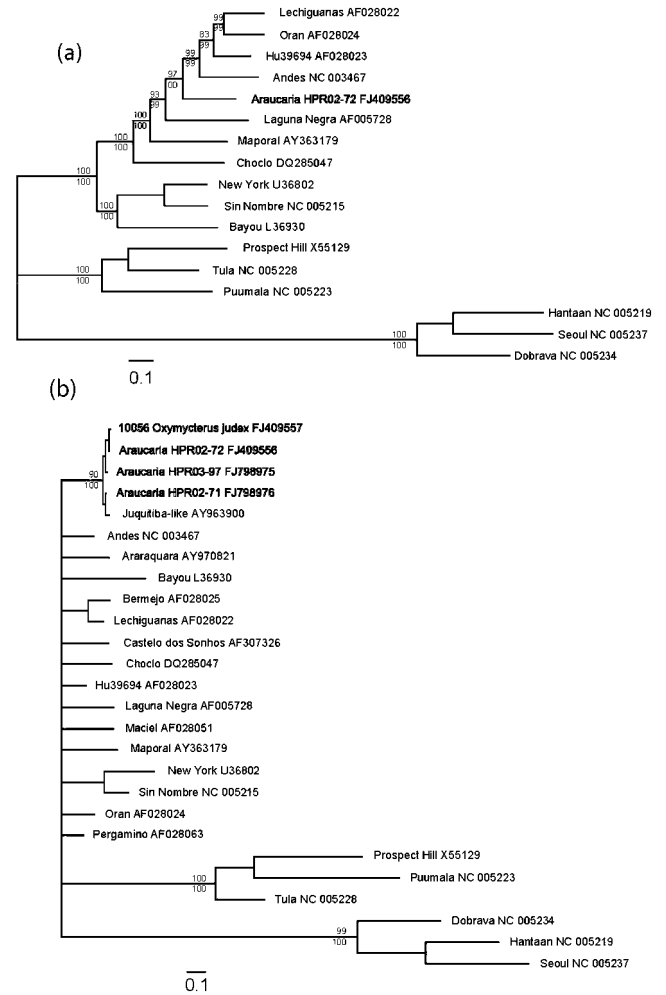


**Fig. 1.** Maximum-likelihood tree based on a 312 nt alignment of the S segment, depicting phylogenetic relationships among hantavirus sequences from Paraná, southern Brazil, and a reference panel of sequences obtained from GenBank. Samples in bold correspond to sequences added in this study from the state of Paraná, Brazil. Support for relevant nodes is provided as maximum-likelihood bootstrap support values (above) and Bayesian posterior probabilities (below). Nodes with support below 50% were collapsed. Phylogenetic resolution other than grouping strains from Paraná with other strains is limited due to the limited amount of sequence data available in public databases. Bar, 0.1 nucleotide substitutions per site.

During our routine epidemiological assessments in the same region of rodent capture, we found a relatively high level of human hantavirus seroprevalence in individuals who had never reported HPS symptoms (Raboni *et al.*, 2007). We found that an *A. montensis* specimen (10027) in this area was infected with a hantavirus genotype that was 25 % different from ARAUV at the nucleotide level in the fragment of the S segment analysed. The virus from specimen 10027 was most closely related to Jaborá virus (JABV; ~ 90 % sequence identity), isolated in Santa Catarina state (southern border of Paraná state; GenBank accession no. EF495338), and was also phylogenetically close to a strain from Paraguay, on the border to the west of Paraná (Chu *et al.*, 2003). In both reports, the identified rodent species was *A. montensis*. Until now, these viruses have not been related to human disease. The co-circulation of two hantaviruses exhibiting differences in virulence could explain the high seroprevalence (8.4 %) observed in individuals without disease history in this region (Raboni *et al.*, 2007).

The complete coding region of the M segment from the human sample HPS/02-72 showed 73 % identity with Laguna Negra virus and 49.5 % with Seoul virus at the RNA level, and 88 and 58 % identity, respectively, at the amino acid level. Phylogenies based on the complete HPS-derived viral M segment showed that ARAUV grouped within the South American hantaviruses (Fig. 2a), and distance comparisons of the complete and partial M segment sequences of ARAUV with the reference sequences revealed that ARAUV was very similar to the partial JUQV-like sequences from *O. nigripes* trapped in this same region (Suzuki *et al.*, 2004), corroborating the data we obtained previously using the complete viral S segments from the same HPS patients (Raboni *et al.*, 2005). A more detailed analysis that included partial sequences derived from two additional human patients (HPR/02-71 and HPR/03-97) and a rodent (*Oxy. judex* 10056) provided further evidence of the strong phylogenetic affinities and high sequence similarities between the JUQV-like sequence reported by Suzuki *et al.* (2004) and the ARAUV-like virus isolated from rodents and humans from Paraná (Fig. 2b). Taken together, our analyses of S and M segments demonstrated that the sequences of ARAUV isolates were very similar to JUQV isolates reported by others (Delfraro *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2004), and, due to historical precedence, we propose that ARAUV should be named JUQ-like virus.

This study provides additional evidence that the scenario of hantavirus transmission in South America could be more complex than previously thought. We found highly similar hantaviruses (JUQ-like virus) occurring in three distantly related rodent species (*O. nigripes*, *A. montensis* and *Oxy. judex*) in the same location, in agreement with the identification of a JUQ-like virus in two different species in Uruguay: *O. nigripes* and *Oxymycterus nasutus* (Delfraro *et al.*, 2008). This could be due to an incidental infection of *A. montensis* and *Oxy. judex* with a JUQ-like virus from *O. nigripes* (the presumed reservoir for JUQ-like virus).



**Fig. 2.** Maximum-likelihood trees depicting phylogenetic relationships between the ARAUV complete segment M sequence (a) and based on a 500 nt alignment of the M segment, depicting phylogenetic relationships among hantavirus sequences from Paraná, southern Brazil (b), compared with a reference panel of sequences obtained from GenBank. Samples in bold correspond to sequences from this study from the state of Paraná (HPR indicates sequences that are from human patients). Support for relevant nodes is provided as maximum-likelihood bootstrap support values (above) and Bayesian posterior probabilities (below). Nodes with support below 50 % were collapsed. Bars, 0.1 nucleotide substitutions per site.

Alternatively, it could imply that host switching is more common than previously believed. It is worth noting that none of the *O. nigripes* specimens trapped in the area of HPS was positive for hantavirus antibodies. In fact, JUQ-like RNA in the HPS area was obtained from *A. montensis* and *Oxy. judex* specimens, suggesting that chronic infection in the two species is possible. We can only speculate that these two rodents act as primary reservoir hosts (able to maintain and transmit the virus for long periods), as there are few data from *in vivo* studies of South

American species. The possibility of human infection through contact with these infected rodents is real, and therefore further investigation of this issue is needed. The fact that *Oxy. judex* could act as a hantavirus reservoir deserves consideration, as this species has broad geographical distribution in areas of HPS transmission in the south of Brazil (Hoffmann *et al.*, 2002).

We found two distantly related viruses (JUQ-like virus and JABV) infecting the same rodent host species: *A. montensis*. Previously, JABV (GenBank accession no. EF492471) RNA was isolated from *A. montensis* rodents in southern Brazil, and Chu *et al.* (2006) found RNA from a hantavirus similar to JABV (strain IP16, GenBank accession no. DQ345764) in *A. montensis* specimens from Paraguay. More recently, an IP16-related hantavirus, strain AC210py (GenBank accession no. EU373732), was identified from a specimen of *Akodon cursor* from Paraguay (Padula *et al.*, 2007). So far, no *Akodon*-borne hantavirus has been reported to be associated with HPS cases in South America (Padula *et al.*, 2007), but precise determination of the true reservoir of JAB-like viruses is needed if we are to elucidate the transmission cycle and role of these viruses in nature. Infection of the same species by distantly related hantaviruses could be interpreted as incidental, but the epidemiological relevance of this infection is not clear. However, the co-circulation of two distinct hantavirus genotypes with the associated potential for genomic reassortment could have an impact on hantavirus transmission dynamics in nature, and thus on human epidemiology.

## Acknowledgements

We are indebted to Gisélia Rubio and Edson dos Santos from Departamento de Vigilância, SESA-PR, Edilson Senczuk from Centro de Controle de Zoonoses of Foz do Iguaçu for helping with rodent trapping logistics. We are also grateful to Drs Adriana Delfraro and Juan Arbiza from Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay, for confirming viral sequencing data and Dr Christian Probst for helpful discussions. We thank Paulo Arauco for technical assistance in sequencing. The authors thank CNPq, CNPq/Prosul, Fiocruz, Fundação Araucária, CYTED/RIVE and Fundo Paraná for financial support. C. N. D. S., P. S. D. and C. R. B. are CNPq fellowship recipients.

## References

- Childs, J. E., Ksiazek, T. G., Spiropoulou, C. F., Krebs, J. W., Morzunov, S., Maupin, G. O., Gage, K. L., Rollin, P. E., Sarisky, J. & other authors (1994). Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as the primary rodent reservoir for a new hantavirus in the southwestern United States. *J Infect Dis* **169**, 1271–1280.
- Chu, Y. K., Owen, R. D., Gonzalez, L. M. & Jonsson, C. B. (2003). The complex ecology of hantaviruses in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg* **69**, 263–268.
- Chu, Y. K., Milligan, B., Owen, R. D., Goodin, D. G. & Jonsson, C. B. (2006). Phylogenetic and geographical relationships of hantavirus

strains in eastern and western Paraguay. *Am J Trop Med Hyg* **75**, 1127–1134.

- Delfraro, A., Tomé, L., D'Elia, G., Clara, M., Achával, F., Russi, J. C. & Rodonz, J. R. (2008). Juquitiba-like hantavirus from 2 nonrelated rodent species, Uruguay. *Emerg Infect Dis* **14**, 1447–1451.
- Elkhoury, M. R. (2005). Aspectos epidemiológicos da infecção e patogenicidade por hantavirus no Brasil. Boletim Epidemiológico Eletrônico. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde 5, 1–5. <http://www.saude.gov.br/svs> (in Portuguese).
- Figueiredo, L. T. M., Moreli, M. L., de Souza, L. M., Borges, A. A., Figueiredo, G. G., Machado, A. M., Bisordi, I., Nagasse-Sugahara, T. K., Suzuki, A. & other authors (2009). Hantavirus pulmonary syndrome, Central Plateau, Southeastern, and Southern Brazil. *Emerg Infect Dis* **15**, 561–567.
- Hoffmann, F. G., Lessa, E. P. & Smith, M. F. (2002). Systematics of *Oxymycterus* with description of a new species from Uruguay. *J Mammal* **83**, 408–420.
- Jobb, G., von Haeseler, A. & Strimmer, K. (2004). TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol Biol* **4** doi:10.1186/1471-2148-1184-1118
- Johnson, A. M., de Souza, L. T. M., Ferreira, I. B., Pereira, L. E., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Peters, J. C. & Nichol, S. T. (1999). Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. *J Med Virol* **59**, 527–535.
- Lednický, J. A. (2003). Hantaviruses: a short review. *Arch Pathol Lab Med* **127**, 30–35.
- Lundkvist, A. & Niklasson, B. (1994). Haemorrhagic fever with renal syndrome and other hantavirus infections. *Rev Med Virol* **4**, 177–184.
- Mills, J. N., Childs, J. E., Ksiazek, T. G., Peters, C. J. & Velleca, W. M. (1995). *Methods for Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing*. U.S. Department of Health & Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA.
- Padula, P. J., Edelstein, A., Miguel, S. D. L., Lopez, N. M., Rossi, C. M. & Rabinovich, R. D. (1998). Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* **241**, 323–330.
- Padula, P. J., Rossi, C. M., Della Valle, M. O., Martínez, P. V., Colavecchia, S. B., Edelstein, A., Miguel, S. D., Rabinovich, R. D. & Segura, E. L. (2000). Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. *J Med Microbiol* **49**, 149–155.
- Padula, P., Martínez, V. P., Bellomo, C., Maidana, S., San Juan, J., Tagliaferri, P., Bargardi, S., Vazquez, C., Colucci, N. & other authors (2007). Pathogenic hantaviruses, northeastern Argentina and eastern Paraguay. *Emerg Infect Dis* **13**, 1211–1214.
- Plyusnin, A. & Morzunov, S. P. (2001). Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol* **256**, 47–75.
- Plyusnin, A., Vapalahti, O. & Vaheri, A. (1996). Hantaviruses: genome, structure, expression and evolution. *J Gen Virol* **77**, 2677–2687.
- Raboni, S. M., Probst, C. M., Bordignon, J., Zeferino, A. & Duarte dos Santos, C. N. (2005). Hantaviruses in Central South America: phylogenetic analysis of the S segment from HPS cases in Paraná, Brazil. *J Med Virol* **76**, 553–562.
- Raboni, S. M., Levis, S., Rosa, E. S. T., Bisordi, I., Delfraro, A., Lemos, E., Correia, D. C. & Duarte dos Santos, C. N. (2007). Hantavirus infection in Brazil: development and evaluation of an enzyme immunoassay and immunoblotting based on N recombinant protein. *Diagn Microbiol Infect Dis* **58**, 89–97.



- Rodriguez, F., Oliver, J. L., Marin, A. & Medina, J. R. (1990).** The general stochastic model of nucleotide substitution. *J Theor Biol* **142**, 485–501.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. (2003).** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574.
- Rosa, E. S., Mills, J. N., Padula, P. J., Elkhoury, M. R., Ksiazek, T. G., Mendes, W. S., Santos, E. D., Araújo, G. C., Martinez, V. P. & other authors (2005).** Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. *Vector Borne Zoonotic Dis* **5**, 11–19.
- Schmaljohn, C. S. & Patterson, J. L. (2001).** *Bunyaviridae*: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 1293–1309. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sousa, R. L. M., Moreli, M. L., Borges, A. A., Campos, G. M., Livonesi, M. C., Figueiredo, L. T. M. & Pinto, A. A. (2008).** Natural host relationships and genetic diversity of rodent-associated hantaviruses in southeastern Brazil. *Intervirology* **51**, 299–310.
- Suzuki, A., Bisordi, I., Levis, S., Garcia, J., Pereira, L. E., Souza, R. P., Sugahara, T. K., Pini, N., Enria, D. & Souza, L. T. (2004).** Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil. *Emerg Infect Dis* **10**, 2127–2134.
- Tischler, N. D., Fernández, J., Müller, I., Martínez, R., Galeno, H., Villagra, E., Mora, J., Ramírez, E., Roseblatt, M. & Valenzuela, P. D. (2003).** Complete sequence of the genome of the human isolate of Andes virus CHI-7913: comparative sequence and protein structure analysis. *Biol Res* **36**, 201–210.

## Hantavirus Infection Prevalence in Wild Rodents and Human Anti-Hantavirus Serological Profiles from Different Geographic Areas of South Brazil

Sonia M. Raboni, Adriana Delfraro, Luana de Borba, Bernardo R. Teixeira, Vanessa Stella, Marina R. de Araujo, Suzana Carstensen, Giselia Rubio, Angela Maron, Elba R. S. Lemos, Paulo S. D'Andrea, and Claudia N. Duarte dos Santos\*

Instituto Carlos Chagas, Fiocruz, Paraná, Brazil; Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brazil; Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay; Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil; Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, Brazil; Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

**Abstract.** Paraná state presents the fourth highest number of accumulated cases of hantavirus pulmonary syndrome in Brazil. To map the risk areas for hantavirus transmission we carried out a study based on rodent trapping and determined the anti-hantavirus seroprevalence in these animals and in the inhabitants of these localities. Overall seroprevalence in rodents and humans were 2.5% and 2.4%, respectively. Eighty-two percent of the seropositive rodents were genetically analyzed. Phylogenetic analyses revealed that hantaviruses from rodent samples cluster with Araucária (Jquitiba-like) or Jaborá hantavirus genotypes. The Jaborá strain was identified in *Akodon serrensis* and *Akodon montensis*, whereas the Araucária strain was detected in *Oligoryzomys nigripes*, *Oxymycterus judex*, *A. montensis*, and *Akodon paranaensis*, with the latter species being identified for the first time as a natural host. These findings expose the complex relationships between virus and reservoirs in Brazil, which could have an impact on hantavirus transmission dynamics in nature and human epidemiology.

### INTRODUCTION

Hantaviruses (*Bunyaviridae*) are emerging rodent-borne and soricomorpha-borne viruses. Two diseases related to hantavirus infection are known, hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) occurring in Eurasia, and hantavirus pulmonary syndrome (HPS), in the Americas.<sup>1,2</sup> New World hantaviruses are hosted by rodents of the Cricetidae family (subfamilies Sigmodontinae, Arvicolinae, and Neotominae), and by Soricomorpha mammals (families Soricidae and Talpidae). Sigmodontine and neotomine rodents are the main hosts of hantaviruses known to cause HPS. The hantavirus genus, includes pathogenic and non-pathogenic viruses, with more than 21 species and 30 genotypes.<sup>3–5</sup>

Since the first description of HPS in the Americas, hantavirus infections are considered a reportable disease in Brazil. Until October 2011, a total of 1,404 cases were confirmed in the country, with a 39% mortality rate (Secretary of Health Surveillance, Brazilian Health Ministry, 2011). Southern Brazil reports the highest number of hantavirus infection in Brazil (~40%) and 38% of these cases occur in the state of Paraná.

In previous studies, we reported the complete genetic characterization of the S and M segments from the Araucária (Jquitiba-like) hantavirus involved in HPS cases in Paraná state, South Brazil.<sup>6,7</sup> This region borders Paraguay and Argentina in the West and the states of Santa Catarina (South) and São Paulo (North). Its main economic activities are agriculture, reforestation, and ecotourism. Over the last 7 years our group has monitored HPS cases reported in Paraná by performing genetic analyses to determine the viral genotypes associated with these cases and rodent trapping to identify the species involved in hantavirus transmission. Epidemiological studies have revealed substantial differences in antibody prevalence in humans and rodents among the various regions of South Brazil, indicating that some communities are experiencing high frequencies of virus exposures.<sup>7–9</sup> Since 2008, a collaborative

network involving our institute, the State Health Department of Paraná and the Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Mammals Reservoirs in Fiocruz, Rio de Janeiro has been responsible for carrying out programmed collections of wild rodents in different ecosystems throughout the state of Paraná and for collecting sera from individuals living in these areas. The aims of this program are to determine the distribution of wild rodents, the prevalence of anti-hantavirus antibodies in rodents and humans, and to identify the virus genotypes circulating in the surveyed areas. This information is then used to delineate necessary control measures.

### MATERIAL AND METHODS

A cross-sectional study was conducted from November 2006 through March 2011 to measure the anti-hantavirus IgG antibody prevalence in rodents and human population. In addition, the detected viruses were genetically characterized.

The procedures involving the use of human serum samples and the manipulation of small mammals were reviewed and approved by the Ethical Committee from the Brazilian Ministry of Health (CONEP) under protocol no. 10573 for the human samples, and no. IAP/PR 292/11 for the animal handling.

**Study locations.** Expedition sites were defined on the basis of reported cases of HPS and on the environmental diversity of the locations, taking into account vegetation type, economic activity, and population density.

**Rodent capture.** A professional staff trained in the capturing and handling of small mammals captured the animals using Tomahawk (40.6 cm × 12.7 cm × 12.7 cm; Tomahawk, WI) and Sherman (7.6 cm × 9.5 cm × 30.5 cm; Tallahassee, FL) live traps set at different sites ranging from wild environments to peridomestic areas (including altered habitats, secondary forests, and rural areas). In addition, in the municipalities with reported human cases, live traps were also set around probable infection sites. Traps were baited with a mixture of peanut butter, banana, oats, and bacon. The animals were identified by morphologic characteristics and further by karyological and genetic analyses. Blood and organs (lung, liver, kidney, and spleen) were collected aseptically. Tissues were frozen in liquid

\* Address correspondence to Claudia N. Duarte dos Santos, Instituto Carlos Chagas/Fiocruz PR, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775 – CIC, 81350-010, Curitiba, PR, Brazil. E-mail: clsantos@tecpar.br

nitrogen and blood was kept at 4°C during transport to the laboratory facilities. All procedures were performed after previously reported standards of biosafety.<sup>10</sup>

**Antibodies assays.** Rodent blood samples were screened for immunoglobulin G (IgG) anti-hantavirus antibodies using an indirect enzymatic immunoassay kit (Hantec, Curitiba, Paraná, Brazil) employing a recombinant Araucária nucleoprotein, according to the manufacture's instructions.<sup>8</sup> The rodents found to be seropositive and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) positive to hantavirus were further confirmed at species level by mitochondrial DNA (cytochrome *B*) sequencing.<sup>11</sup> Serum samples were collected from members of the resident population by peripheral blood collection, after they had signed a consent form to participate in the study. Individuals < 18 years of age were excluded from the study. Human sera samples were collected depending on the availability of health care professionals to perform vein puncture procedure at the same locals of rodent trapping. Sampling of humans and rodents were done at same time. Blood samples were screened for IgG anti-hantavirus antibodies using the Hantec kit and positive samples were confirmed by an immunoblotting assay.

**Hantavirus genetic characterization.** Tissues (lung, liver, and/or kidney) from antibody-positive rodents were analyzed by RT-PCR to amplify the partial S segment. The molecular tests were carried out using various sets of primers that have been described previously.<sup>6,7,12</sup> The PCR products were purified (High Pure PCR kit, Roche Inc., Mannheim, Germany) and both strands were sequenced by the commercial MacroGen facility (Seoul, Republic of Korea).

**Sequence analyses.** Genomic sequences of the partial S segment were aligned with hantavirus sequences retrieved from GenBank. A total of 60 S segment sequences were analyzed, including the main South American hantavirus genotypes, and representative virus genotypes from North American and

Eurasia (see figure legends for details). Alignments were constructed using the BioEdit v7.0.9.0 package. For phylogenetic inferences, the best-fit model of evolution and associated parameters were calculated using ModelGenerator software (<http://bioinf.may.ie/software/modelgenerator>). Phylogenies were constructed using the Bayesian inference method (MrBayes v3.1.2; <http://mrbayes.csit.fsu.edu>) and the maximum likelihood (ML) method (PhyML v3.0.<sup>13</sup> Bayesian analyses were conducted under the general time reversible + gamma + proportion invariant model. Two runs of four chains each (one cold, three heated, temperature 0.20) were run for three million generations; trees were sampled every 100 generations. Convergence was assessed by using the average standard deviation in partition frequency values across independent analyses with a threshold value of 0.01; burn-in was set to 25%. For the ML estimation of phylogeny, the model of evolution and parameters used were as described above, initial trees were calculated using the BioNJ option and the tree searching option was set to NNI. For both analyses, sequences of the Hantaan and Seoul hantaviruses were used as outgroup species. The node supports were calculated using the approximate likelihood ratio test (aLRTs).<sup>14</sup>

## RESULTS

**Places of collection.** A total of 11 trapping expeditions were carried out until March 2011 with a general trap success near 4.5%. Figure 1 shows the regions studied and those having hantavirus-positive results. Seven hundred forty-eight small mammals were captured during the study; 667 of them were rodents. The genus and/or species of these animals and their distribution by region are shown in Table 1.

**Prevalence of anti-hantavirus IgG in rodent and human populations.** A total of 2.5% (17 of 667) of the trapped rodents were anti-hantavirus IgG-positive and 88% (15 of 17)

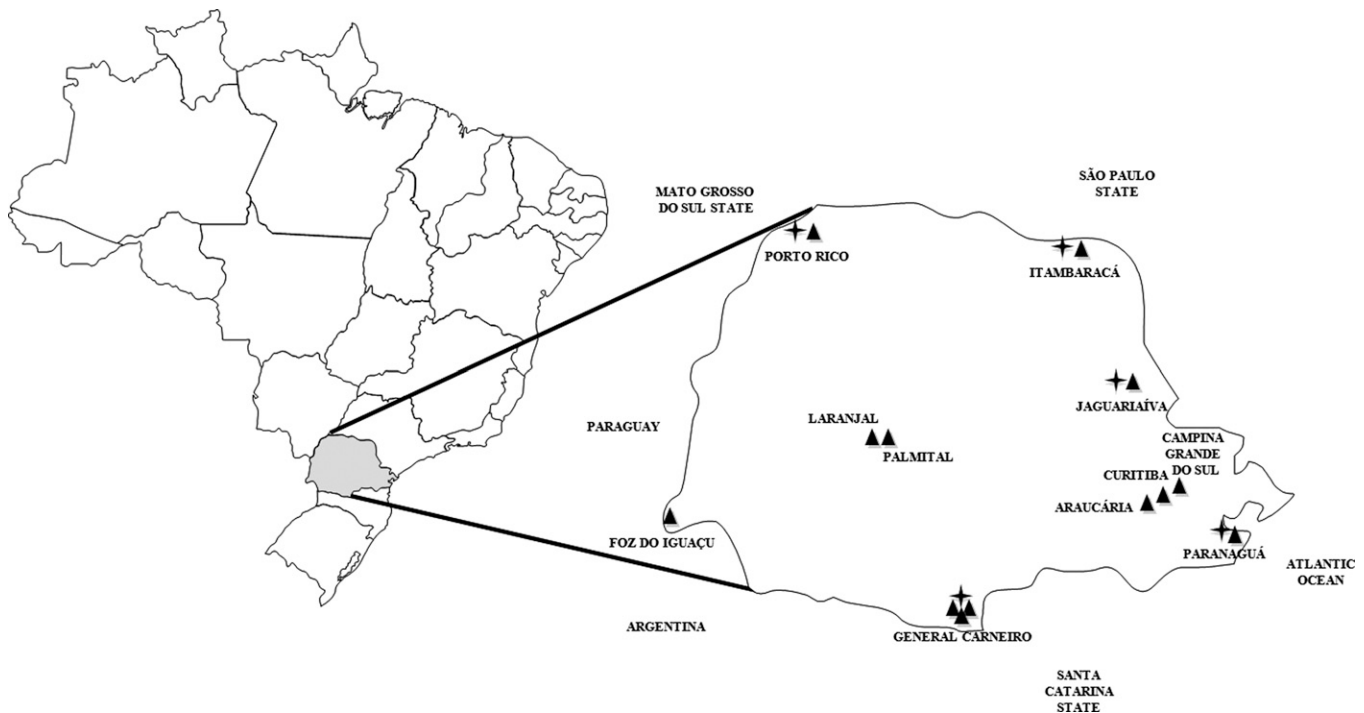


FIGURE 1. State of Paraná, Brazil. ▲: Places of collections. ✦: Rodents with positive serology for hantavirus.

TABLE 1

Small mammals captured in State of Paraná, Southern Brazil, 2006–2009

Place and date of collection Total of collection	Small mammals	N (%)	
<b>Southern</b>			
General Carneiro (26°25'39"S 51°18'56"W) November, 2006 N = 72	<b>RODENTIA</b>		
	<i>Akodon montensis</i>	31 (44%)	
	<i>Akodon serrensis</i>	20 (28%)	
	<i>Akodon paranaensis</i>	4 (6%)	
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	7 (10%)	
	<i>Thaptomys nigrita</i>	3 (4%)	
	<i>Oxymycterus judex</i>	2 (2%)	
	<i>Sooretamys angouya</i>	2 (2%)	
	<b>DIDELPHIMORPHIA</b>		
	<i>Monodelphis sp.</i>	3 (4%)	
	General Carneiro December, 2009 N = 57	<b>RODENTIA</b>	
<i>Akodon serrensis</i>		30 (53%)	
<i>Akodon montensis</i>		10 (18%)	
<i>Akodon paranaensis</i>		4 (7%)	
<i>Oxymycterus judex</i>		7 (12%)	
<i>Thaptomys nigrita</i>		3 (5%)	
<i>Sooretamys angouya</i>		1 (2%)	
<b>DIDELPHIMORPHIA</b>			
<i>Monodelphis sp.</i>		2 (3%)	
General Carneiro March, 2010 N = 85		<b>RODENTIA</b>	
		<i>Akodon serrensis</i>	26 (31%)
	<i>Akodon montensis</i>	24 (28%)	
	<i>Akodon paranaensis</i>	6 (7%)	
	<i>Oxymycterus judex</i>	18 (21%)	
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	2 (2%)	
	<b>DIDELPHIMORPHIA</b>		
	<i>Philander frenatus</i>	4 (5%)	
	<i>Monodelphis sp.</i>	4 (5%)	
	<i>Lutreolina crassicaudata</i>	1 (1%)	
	<b>Northeastern</b>		
Itambaracá (22°58'21"S 50°28'44"W) N = 74	<b>RODENTIA</b>		
	<i>Akodon montensis</i>	14 (19%)	
	<i>Mus musculus</i>	25 (34%)	
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	11 (15%)	
	<i>Rattus rattus</i>	4 (5%)	
	<b>DIDELPHIMORPHIA</b>		
	<i>Didelphis albiventris</i>	20 (27%)	
	<b>Jaguariaíva</b>		
(24°15'04"S 49°42'21"W) N = 54	<b>RODENTIA</b>		
	<i>Akodon montensis</i>	21 (39%)	
	<i>Calomys tener</i>	12 (22%)	
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	6 (11%)	
	<i>Euryoryzomys russatus</i>	8 (15%)	
	<i>Oxymycterus sp.</i>	5 (9%)	
	<b>DIDELPHIMORPHIA</b>		
	<i>Didelphis albiventris</i>	2 (4%)	
<b>Northwestern</b>			
Porto Rico (22°46'20"S 53°16'01"W) N = 45	<b>RODENTIA</b>		
	<i>Oligoryzomys sp.</i>	18 (40%)	
	<i>Akodon sp.</i>	10 (22%)	
	<i>Oecomys bicolor</i>	6 (13%)	
	<i>Thaptomys nigrita</i>	5 (11%)	
	<i>Mus musculus</i>	3 (7%)	
	<i>Calomys tener</i>	2 (5%)	
	<i>Rattus rattus</i>	1 (2%)	
<b>Western</b>			
Foz do Iguaçu (25°32'52"S 54°35'17"W) N = 115	<b>RODENTIA</b>		
	<i>Akodon montensis</i>	62 (54%)	
	<i>Mus musculus</i>	44 (39%)	
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	3 (2%)	
	<i>Thaptomys nigrita</i>	3 (2%)	
	<b>DIDELPHIMORPHIA</b>		
	<i>Didelphis aurita</i>	1 (1%)	
<i>Didelphis albiventris</i>			

(Continued)

TABLE 1  
Continued

Place and date of collection Total of collection	Small mammals	N (%)	
<b>Central-Western</b>			
Laranjal/Palmital (24°53'12"S 52°28'10"W) (24°53'35"S 52°12'10"W) N = 25	<b>RODENTIA</b>		
	<i>Akodon sp.</i>	17 (68%)	
	<i>Mus musculus</i>	6 (24%)	
	<b>DIDELPHIMORPHIA</b>		
<i>Monodelphis sp.</i>	2 (8%)		
<b>Eastern</b>			
Paranaguá (Coast) (25°31'12"S 48°30'33"W) N = 71	<b>RODENTIA</b>		
	<i>Akodon montensis</i>	25 (35%)	
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	18 (25%)	
	<i>Thaptomys nigrita</i>	9 (13%)	
	<i>Nectomys squamipes</i>	8 (11%)	
	<i>Euryoryzomys russatus</i>	4 (6%)	
	<i>Rattus rattus</i>	3 (4%)	
	<i>Sooretamys angouya</i>	1 (2%)	
	<b>DIDELPHIMORPHIA</b>		
	<i>Didelphis sp.</i>	3 (4%)	
	Curitiba (25°25'40"S 49°16'23"W) N = 27	<b>RODENTIA</b>	
<i>Akodon montensis</i>		7 (26%)	
<i>Akodon paranaensis</i>		7 (26%)	
<i>Oligoryzomys nigripes</i>		6 (22%)	
<i>Mus musculus</i>		3 (11%)	
<b>DIDELPHIMORPHIA</b>			
<i>Monodelphis sp.</i>		4 (15%)	
Araucária (25°35'35"S 49°24'37"W) N = 33		<b>RODENTIA</b>	
		<i>Akodon montensis</i>	12 (37%)
		<i>Akodon paranaensis</i>	5 (15%)
		<i>Oligoryzomys nigripes</i>	9 (27%)
	<i>Mus musculus</i>	7 (21%)	
	<b>RODENTIA</b>		
	<i>Akodon sp.</i>	54 (60%)	
	<i>Thaptomys nigrita</i>	16 (18%)	
	<i>Rattus rattus</i>	7 (8%)	
	<i>Oxymycterus sp.</i>	4 (5%)	
	<i>Nectomys squamipes</i>	3 (3%)	
<i>Rattus rattus</i>	1 (1%)		
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	1 (1%)		
<i>Oryzomys russatus</i>	1 (1%)		
<i>Oryzomys angouya</i>	1 (1%)		
<b>DIDELPHIMORPHIA</b>			
<i>Monodelphis sp.</i>	2 (2%)		

were also found to be hantavirus-positive by RT-PCR. Human seroprevalence analysis was performed for a total of 1,038 sera randomly collected from adults (> 18 years of age) without reported classical HPS signs, in which an overall of 2.4% (25 of 1,038) were anti-hantavirus IgG-positive (Table 2).

General Carneiro county, located in the southern area of Paraná, is the region with the highest incidence of HPS cases. In this locality, three capture expeditions were conducted at three different times (November 2006, December 2009, and March 2010). Regarding the other regions reported in this study, one capture expedition was performed per locality. The original vegetation of General Carneiro county was Atlantic interior forest, but this has been gradually replaced by pine tree reforestation, which represents the main economic activity. The majority of the HPS patients in this region worked in wood extraction in the secondary growth forests.<sup>7</sup> A total of 214 small mammals were captured in three expeditions and their identification is displayed in Table 1. Eight seropositive rodents were detected in General Carneiro County and this locality displayed the highest prevalence of anti-hantavirus antibodies in human population, compared with the other studied areas (8.4%), (Table 2).

TABLE 2

Collection locations, numbers of small mammals captured, rodent seroprevalence, positive species, hantavirus genotype, and human seroprevalence, Brazil

Region of state of Paraná Cities	Total small mammals	Rodent seroprevalence N (% positive) Species (N)	Hantavirus genotype	Human seroprevalence N (% positive)	HPS reported area
Southern					
General Carneiro	214	8 (3.7%)		N = 107	Yes
	–	<i>Oxymycterus judex</i> (01)	Araucaria (01)	8.4%	
		<i>Akodon montensis</i> (05)	Araucaria (01)		
			Jaborá (04)		
		<i>Akodon serrensis</i> (01)	Jaborá (01)		
Palmas		<i>Akodon paranaensis</i> (01)	Araucaria (01)	N = 145	Yes
		–	–	2.7%	
Northeastern		1 (1.3%)		N = 164	No
Itambaracá	74	<i>Oligoryzomys nigripes</i> (01)	Araucária (01)	0%	
Jaguariaíva	54	2 (3.7%)		N = 153	No
		<i>Akodon montensis</i> (01)	Jaborá (01)	1.3%	
		<i>Oligoryzomys nigripes</i> (01)	Araucária (01)		
Northwestern					
Porto Rico	45	2 (4.4%)		Not done	Yes
		<i>Oligoryzomys nigripes</i> (02)	Araucária (02)		
Western					
Foz do Iguaçu	115	0 (0%)	–	N = 199	Yes
Central-Western			–	0.5%	
Palmital/Laranjal	25	0 (0%)		N = 270	Yes
Eastern				3.3%	
Paranaguá (Coast)	71	4 (5.6%)		Not done	Yes
		<i>Akodon montensis</i> (01)	–		
		<i>Oligoryzomys nigripes</i> (03)	Araucária (02)		
Curitiba	27	0 (0%)		Not done	Yes
Araucária	33	0 (0%)		Not done	No
Campina Grande do Sul	90	0 (0%)		Not done	Yes

The municipalities of Itambaracá and Jaguariaíva, located in the northeastern portion of Paraná, are both areas of savannah and Atlantic forest fragments, where agriculture is the main economic activity. A total of 128 small mammals were captured in Itambaracá and Jaguariaíva during the study (Table 1). Anti-hantavirus antibodies were found in 5% of the captured animals, and no HPS cases have been reported in these areas. No seropositive human samples were found in Itambaracá but 1.3% of the serum samples from Jaguariaíva were positive.

Porto Rico county, located in the northwest part of Paraná, borders with Mato Grosso do Sul. Tourism is its main source of income. Only one rodent capture expedition was carried out in this region, and the seropositivity prevalence for these animals was 4.4% (Table 1).

Foz do Iguaçu (Iguaçu Falls), located in the western part of the state, is a plateau region with a subtropical climate and a subtropical rain forest, and is bordered by Paraguay and Argentina. The main economic activity is tourism, electricity generation, and trade. One hundred fifteen small mammals were captured (Table 1) and all were found to be negative for hantavirus antibodies. One seropositive human serum sample was found in this region (0.5%).

Palmital and Laranjal counties are both located in Midwestern region of Parana. Twenty-three rodents were trapped in this region (Table 1), but none were positive for anti-hantavirus IgG. However, HPS cases have been reported in this locality and the human anti-hantavirus seroprevalence was 3.3%.

The city of Paranaguá is located in eastern Paraná on the Atlantic coast. The main economic activities of the region are related to the Paranaguá port and trade. Seventy-two small mammals were caught here (Table 1), four of them were positive for anti-hantavirus IgG (5.6%). Hantavirus pulmonary syndrome cases have been reported in this locality.

Curitiba (the state capital of Paraná) and the metropolitan region (Araucária and Campina Grande do Sul), located in the eastern part of the state, have a humid subtropical climate. In Curitiba, animals were trapped in peridomestic habitats near the home of a patient who died of HPS. One hundred forty-nine animals were caught (Table 1), however none of them were found to be seropositive for anti-hantavirus antibodies.

**Phylogenetic relationships among hantaviruses.** The Bayesian phylogenies of hantavirus partial S segment sequences are shown in Figures 2 and 3. In Figure 2 the phylogenetic tree corresponds to a 631 nt alignment, spanning nucleotides 152–782 of S segment, and in Figure 3 the tree was constructed using a subset of sequences from Figure 2, spanning nucleotides 978–1,250 of S segment (nucleotide positions relative to ARAUV strain AY740633). In both trees, genomic sequences of hantaviruses identified in rodents from different localities of Paraná grouped with high statistical support into the Araucária (ARAUV) and Jaborá (JABV) clades. The majority (7 of 12) of the S sequences belonged to the Araucária clade. They were retrieved from two *Oligoryzomys nigripes* specimens trapped in Paranaguá (10104 and 10091) and from rodents 10056 (*Oxymycterus judex*) and 10028 (*Akodon montensis*) collected in General Carneiro. Two additional sequences were found in *O. nigripes* specimens captured at Jaguariaíva (10351) and Itambaracá (10217) also belong to this clade (Figure 2). An additional sequence retrieved from a rodent captured in General Carneiro groups within the ARAUV clade (Figure 3) with a posterior probability (pp) of 1. This rodent was identified as *A. paranaensis* by its morphology, karyotype, and cytochrome *B* gene sequence.

Three viral genomic S sequences from rodents trapped in General Carneiro in March 2010 and one collected in Jaguariaíva are placed in the Jaborá clade, with significant

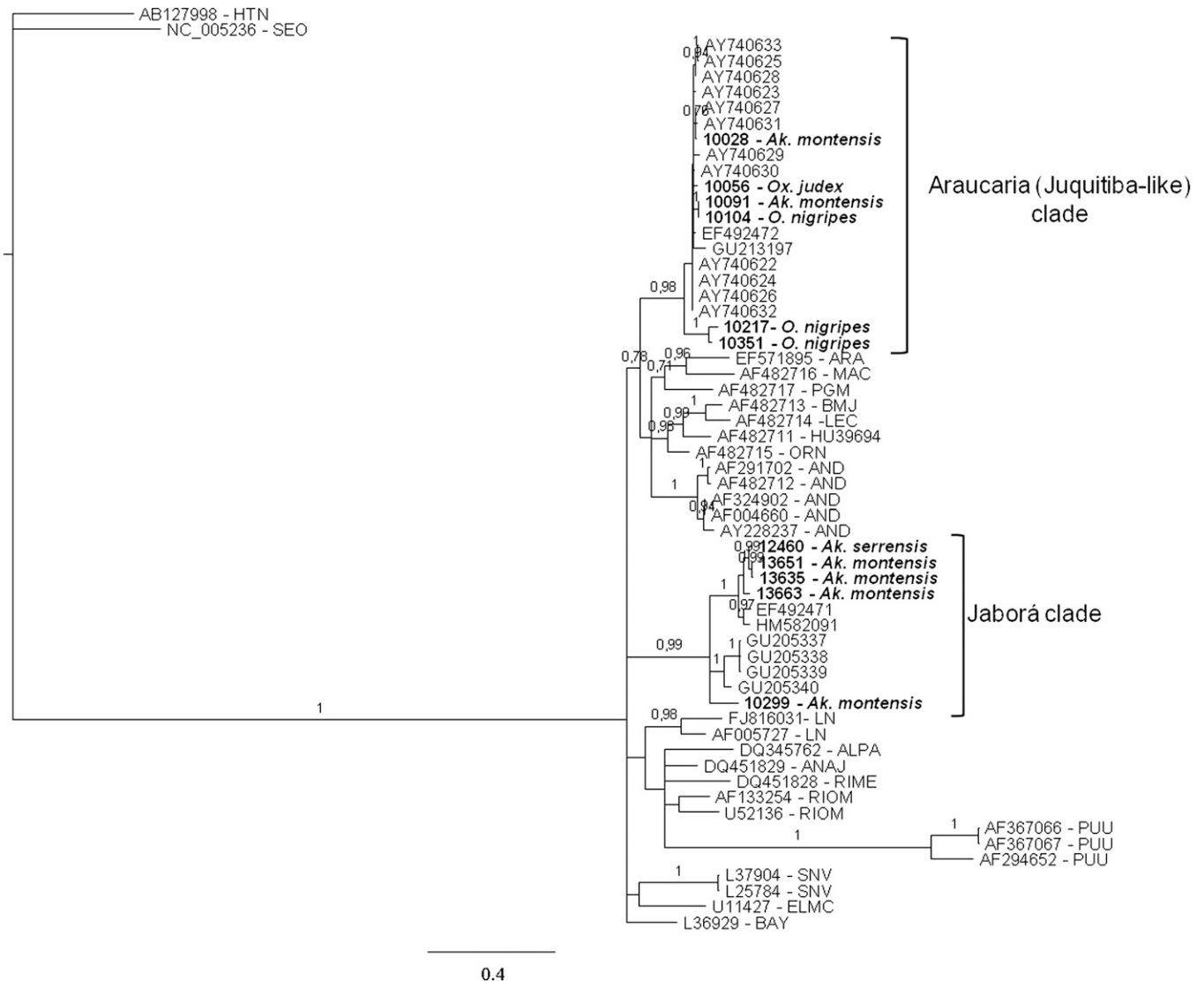


FIGURE 2. Bayesian phylogenetic analysis of partial S segment sequences from rodents captured in different Paraná localities (in boldface). For comparison, a set of representative hantavirus sequences from Brazil, South America, North America, and Eurasia were included in the analysis. Alignment used in the analysis was 631 nt long, spanning nucleotides 152–782 of S segment, respect to ARAUV strain AY740633. Hantaan (HTNV) and Seoul (SEOV) sequences were used as outgroup species. Posterior probabilities (pp) are depicted above the nodes. GenBank accession nos.: 12460: HQ337904; 10217: HQ337905; 10351: HQ337906; 10104: HQ3379047; 13663: JN252310; 13635: JN252313; 13651: JN252311; 10299: JN252312.

statistical support ( $P = 0.99$ ), together with Jaborá strains from Brazil and Paraguay. An additional viral S sequence from an *A. serrensis* specimen, collected in General Carneiro in December 2009 is placed into Jaborá clade. All these animals were identified as *A. montensis* and *A. serrensis* by their morphologies, karyotypes, and cytochrome *B* gene sequences (Figure 2).

Maximum likelihood analyses (not shown, available upon request) were also performed. Phylogenies obtained under this method displayed the same topology as the Bayesian analysis at the relevant nodes.

## DISCUSSION

The HPS has been reported every year in the state of Paraná since 1993, with the highest number of confirmed cases occurring in southern and southwestern regions. The

biogeography with its particular vegetation landscape and agricultural practices of these regions are distinct from other regions in Paraná. Nevertheless, there is little information available on the epidemiology, severity of disease, and ecology of the hantavirus reservoirs.

Previously, we had reported a correlation between rodent density and virus transmission, with the description of outbreaks associated to pine tree reforestation area, with bamboo blooming and mast seeding in southern Brazil.<sup>6</sup> Subsequently, we demonstrated the presence of the same hantavirus in three different rodent species, and the co-circulation of two different strains in the same rodent species, highlighting the complexity of hantavirus transmission dynamics in nature.<sup>7</sup> Similar findings were previously reported for a Jujutiba-like hantavirus harbored by two different rodent species in Uruguay,<sup>15</sup> stressing the point that hantavirus/reservoir species relationships in South America might be more complex than the typically

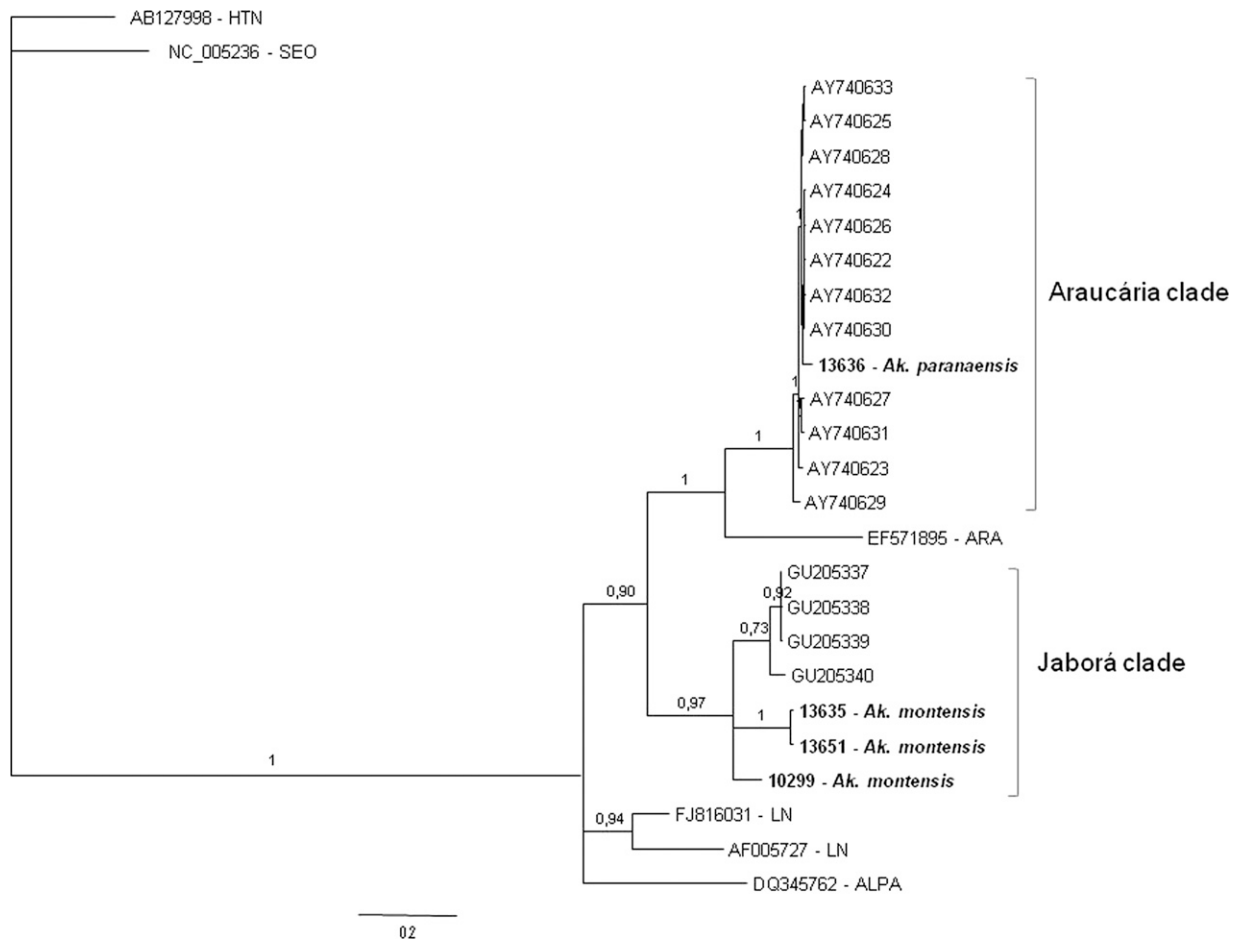


FIGURE 3. Bayesian phylogenetic analysis of partial S segment sequences from rodents captured in different Paraná localities (in boldface). For comparison, a subset of the sequences shown in Figure 2 (from Brazil, Paraná, and Paraguay) was used in the analysis. Paraná strains are 272 nt long and spanned nucleotides 978–1,250 of S segment, respect to ARAUV strain AY740633. Hantaan (HTNV) and Seoul (SEOV) sequences were used as outgroup species. Posterior probabilities (pp) are depicted above the nodes. GenBank accession nos.: 13636: JN252309.

predominant association of one hantavirus strain and one rodent reservoir species.

The most abundant rodent species captured during this study were *Akodon* spp., followed by *O. nigripes* and *Oxymycterus* sp., both of the latter two have been previously implicated as potential pathogenic hantavirus reservoirs.<sup>7,15</sup> The mean hantavirus antibody seroprevalence found in rodents in this study was 2.5% (with a regional range of 0% to 5.6%). Similar seroprevalence values have been reported for other American countries, such as 3.5% in Mexico,<sup>16</sup> 1.4% in Chile,<sup>17</sup> 5.6% in Argentina<sup>18</sup> and 2.1% in Colombia.<sup>19</sup> Recently, Armien and others<sup>20</sup> reported a rodent prevalence of antibodies against Choclo virus ranging from 3% to 33% in neighborhoods where HPS cases have occurred in western Panamá.

The mean value for hantavirus antibody seroprevalence in humans in Paraná was 2.4%, but ranging from 0% to 8%, depending on the region. The highest seroprevalence was from individuals living in areas where HPS cases have been reported. Seroprevalence results from other South American countries and other regions in Brazil revealed different frequencies of hantavirus exposure, such as 32.9% in western region of Panamá, 13.5% in Colombia,<sup>21</sup> 1.7% in Venezuela,<sup>22</sup> 4.7% in the Anajatuba municipality, state of Maranhão, Brazil,<sup>23</sup> 10.9% in rural residents of the Anajatuba municipality,<sup>24</sup> and 14.3% in Jardimópolis, southeastern Brazil.<sup>25</sup> Such

differences in anti-hantavirus seroprevalence show high levels of virus exposure in these populations and draw attention to the possibility of asymptomatic or less virulent infections. In agreement, a high incidence rate of hantavirus infections without HPS was observed in four communities of western Panamá, where 70 individuals seroconverted during the surveyed period (2001–2007) without HPS classical signs.<sup>20</sup>

The results from this study suggest a positive correlation between the percentage of seropositive rodents and HPS cases. On the other hand, anti-hantavirus IgG-positive rodent reservoirs were identified in areas without reported cases, suggesting that the geographic distribution of reservoir rodent species alone is not enough to link a particular area with disease risk. Other factors, such as seasonality, population density, and human behavior must be included in risk analyses. Furthermore, HPS outbreaks have been linked to precipitation; however, climatic factors alone have not been sufficient to predict the spatial-temporal dynamics of the environment-reservoir-virus system.<sup>26</sup>

In all studied areas, two hantavirus genotypes were identified: Araucária and Jaborá. Phylogenetic analysis showed that six rodent-borne hantaviruses cluster together with high statistical support with Araucaria (Jequitiba-like) virus identified in HPS cases and rodents from Brazil and Paraguay. It is a homogenous group, sharing a 97%/100% of similarity at

nucleotide/amino acid level. It can be considered as a sister clade to a group formed by several South American hantaviruses, including pathogenic viruses like Andes, Lechiguana, and Araraquara, as well as non-pathogenic hantaviruses like Maciel or Pergamino. Another five rodent-borne hantaviruses from Paraná state form a monophyletic group with Jaborá hantaviruses from Paraguay and Brazil (Santa Catarina state). This group shares a 92%/99.9% identity at nucleotide/amino acid level, respectively, and contains viruses collected mostly from *A. montensis*, and one from *A. serrensis*. The partial S sequences analyzed here are not informative enough to determine the relationships of this genotype with other South American hantaviruses. It is noteworthy that the hantaviruses identified in different *Akodon* species (*A. montensis* and *A. serrensis*) from General Carneiro are more closely related than the *A. montensis*-borne hantavirus from Jaguariaíva (10299), raising the possibility of a spillover infection from *A. montensis* to *A. serrensis*. The phylogenetic tree displayed in Figure 3 was constructed using a subset of sequences encompassing nucleotides 978 to 1,250 from Araucaria virus (AY740633). In this analysis a hantavirus genomic sequence retrieved from an *A. paranaensis* specimen collected in General Carneiro was placed into the Araucaria group with high statistical support (posterior probability of 1). The intragenotypic identity was 99.5%/100% at nucleotide/amino acid level, respectively.

In some regions, viral co-circulation was observed in trapped rodents and both genotypes have been previously described in South Brazil.<sup>7,9</sup> Nonetheless, only the Araucaria hantavirus has been detected in patients with HPS and the Jaborá virus has not yet been associated with human diseases.<sup>9</sup> Generally, sigmondontine rodents have been captured in disturbed habitats, such as cultivated fields, reforested areas, and peridomestic settings. However, host population and pathogen prevalence may vary locally and many rodent species show distinct habitat preferences. Thus, additional local studies are essential to define the risk of human disease.<sup>27</sup>

The presence of different rodent species within the same natural setting and are infected by the same hantavirus genotype, has been previously reported.<sup>7,9,17,28</sup> In this study, *A. paranaensis* was found for the first time to be infected with Araucaria hantavirus, making a total of four different rodent species that are associated with the same hantavirus genotype. The impact of this number of host species on the natural transmission cycle remains unclear. Jaborá virus was found in the previously reported host (*A. montensis*) and also in *A. serrensis*, which has not been previously identified as a hantavirus reservoir. Interestingly, both species were captured in the same locality (General Carneiro) but in different seasons (March 2010 and December 2009, respectively).

Hantavirus infections have been described with a wide variety of clinical forms, from asymptomatic to the classical clinical manifestations of HFRS and HPS.<sup>29,30</sup> Although serologic evidence indicated that hantavirus circulated in human and rodent populations in all regions of the Paraná state, classical HPS cases have not been reported in all regions (i.e., North-western and Northeastern Paraná), suggesting that either oligo/asymptomatic infections occurs. It cannot be ruled out that occasionally hantavirus infection are not recognized or reported. It seems likely that pathogen exposure varies among these different areas, which could have practical implications on disease transmission.

Recently, several novel hantaviruses with unknown pathogenic potential were identified in widely separated geographical regions in a variety of soricomorpha mammals. Nothing is known about the pathogenicity of these hantaviruses at the moment, but finding these viruses among such evolutionary divergent species, predicts that other groups of mammals could also carry these viruses.<sup>31</sup> Notably, in the Itambaracá region, 27% of the animals captured was *Didelphis albiventris*. Although serologically positive rodents were detected in this region, RT-PCR analyses of lung samples from these animals were negative for hantavirus.

It is important to mention that the main objective of this study was to determine the serological status of the human population and of the potential rodent reservoirs regarding hantavirus exposure in different biomes of Paraná State. For this reason, some expeditions were performed only once per area. Hence, we are aware that these particular data relate only to one period and reflect the landscape only for that time. However, human seroprevalence data (from individuals without previous HPS classical clinical presentations) and the distributions of seropositive reservoir species will assist health authorities in adjusting their prevention policies and defining a permanent surveillance program for the entire region.

Although the impacts of environmental change and degradation on the dispersion dynamics of the seropositive rodent reservoir have not been evaluated, it has been suggested that habitat fragmentation and the loss of species diversity may be altering hantavirus infection dynamics.<sup>32</sup> In the last several decades, Paraná has witnessed high rates of environmental degradation and human population growth. The impacts of the consequential losses in biodiversity on human health should be monitored and the complex factors involved in the dynamics of hantaviruses in nature.

Received December 6, 2011. Accepted for publication April 25, 2012.

Acknowledgments: We thank the Public Health Secretary of the State of Paraná for their assistance in the rodent capture expeditions and human blood collection.

Financial support: Fiocruz, CNPq, Fundação Araucária, CAPES. SMR and CNDS are sponsored by a CNPq fellowship.

Disclaimer: The authors have no competing financial interests.

Authors' addresses: Sonia M. Raboni, Infectious Disease Department, Universidade Federal do Paraná, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz, Paraná, Brazil, E-mail: sraboni@ufpr.br. Adriana Delfraro, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay, E-mail: adelfraro@gmail.com. Luana de Borba, Vanessa Stella, Marina R. de Araujo, Suzana Carstensen, and Claudia N. Duarte dos Santos, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz, Paraná, Brazil, E-mails: luturtle@onda.com.br, vastella1@hotmail.com, marinaaraujo@hotmail.com, suzana\_carstensen@yahoo.com.br, and clsantos@tecpa.br. Bernardo R. Teixeira, Programa de Pós graduação em Biologia Parasitária, Fiocruz, Rio de Janeiro; and Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, E-mail: brt@ioc.fiocruz.br. Giselia Rubio and Angela Maron, Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, Brazil, E-mails: giseliarubio@sesa.pr.gov.br and angela.maron@gmail.com. Elba R. S. Lemos and Paulo S. D'Andrea, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, E-mails: elemos@ioc.fiocruz.br and dandrea@ioc.fiocruz.br.

## REFERENCES

1. Meyer BJ, Schmaljohn CS, 2000. Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms. *Trends Microbiol* 8: 61–67.
2. Peters CJ, Simpson GL, Levy H, 1999. Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. *Annu Rev Med* 50: 531–545.



3. Nelson R, Canate R, Pascale JM, Dragoo JW, Armien B, Armien AG, Koster F, 2010. Confirmation of Choclo virus as the cause of hantavirus cardiopulmonary syndrome and high serum antibody prevalence in Panama. *J Med Virol* 82: 1586–1593.
4. Puerta H, Cantillo C, Mills J, Hjelle B, Salaza-Bravo J, Mattar S, 2006. Hantavirus del Nuevo mundo – ecología y epidemiología de un virus emergente en latinoamerica. *Medicina (B Aires)* 66: 343–356.
5. Mir MA, 2010. Hantaviruses. *Clin Lab Med* 30: 67–91.
6. Raboni SM, Rubio G, DE Borba L, Zeferino A, Skraba I, Goldenberg S, Dos Santos CN, 2005. Clinical survey of hantavirus in southern Brazil and the development of specific molecular diagnosis tools. *Am J Trop Med Hyg* 72: 800–804.
7. Raboni SM, Hoffmann FG, Oliveira RC, Teixeira BR, Bonvicino CR, Stella V, Carstensen S, Bordignon J, D'Andrea PS, Lemos ER, Duarte Dos Santos CN, 2009. Phylogenetic characterization of hantaviruses from wild rodents and hantavirus pulmonary syndrome cases in the state of Parana (southern Brazil). *J Gen Virol* 90: 2166–2171.
8. Raboni SM, Levis S, Rosa ES, Bisordi I, Delfraro A, Lemos E, Correia DC, Duarte Dos Santos CN, 2007. Hantavirus infection in Brazil: development and evaluation of an enzyme immunoassay and immunoblotting based on *N recombinant protein*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58: 89–97.
9. Oliveira RC, Padula PJ, Gomes R, Martinez VP, Bellomo C, Bonvicino CR, Lima DI, Bragagnolo C, Caldas AC, D'Andrea PS, Lemos ER, 2011. Genetic characterization of hantaviruses associated with sigmodontine rodents in an endemic area for hantavirus pulmonary syndrome in southern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 301–314.
10. Mills JN, Childs JE, Ksiazek T, Peters C, 1995. *Methods for Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention.
11. Smith MF, Patton JL, 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biol J Linn Soc Lond* 50: 149–177.
12. Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, Peters CJ, Nichol ST, 1997. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* 238: 115–127.
13. Guindon S, Gascuel O, 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696–704.
14. Anisimova M, Gascuel O, 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 55: 539–552.
15. Delfraro A, Tome L, D'Elia G, Clara M, Achaval F, Russi JC, Rodonz JR, 2008. Juquitiba-like hantavirus from 2 nonrelated rodent species, Uruguay. *Emerg Infect Dis* 14: 1447–1451.
16. Castro-Arellano I, Suzan G, Leon RF, Jimenez RM, Lacher TE Jr, 2009. Survey for antibody to hantaviruses in Tamaulipas, Mexico. *J Wildl Dis* 45: 207–212.
17. Medina RA, Torres-Perez F, Galeno H, Navarrete M, Vial PA, Palma RE, Ferres M, Cook JA, Hjelle B, 2009. Ecology, genetic diversity, and phylogeographic structure of andes virus in humans and rodents in Chile. *J Virol* 83: 2446–2459.
18. Mills JN, Schmidt K, Ellis BA, Calderon G, Enria DA, Ksiazek TG, 2007. A longitudinal study of hantavirus infection in three sympatric reservoir species in agroecosystems on the Argentine Pampa. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7: 229–240.
19. Aleman A, Iguaran H, Puerta H, Cantillo C, Mills J, Ariz W, Mattar S, 2006. First serological evidence of hantavirus infection in rodents in Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota)* 8 (Suppl 1): 1–12.
20. Armien B, Pascale J, Munoz C, Lee SJ, Kook L, Choi MA, Broce C, Armien A, Gracia F, Hjelle B, Koster F, 2011. Incidence rate for hantavirus infections without pulmonary syndrome, Panama. *Emerg Infect Dis* 17: 1936–1939.
21. Mattar S, Parra M, 2004. Serologic evidence of hantavirus infection in humans, Colombia. *Emerg Infect Dis* 10: 2263–2264.
22. Rivas YJ, Moros Z, Moron D, Uzcategui MG, Duran Z, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE, 2003. The seroprevalences of anti-hantavirus IgG antibodies among selected Venezuelan populations. *Ann Trop Med Parasitol* 97: 61–67.
23. Mendes WS, da Silva AA, Neiva RF, Costa NM, de Assis MS, Vidigal PM, da GL Leite M, da Rosa ES, de A Medeiros DB, de B Simith D, da C Vasconcelos PF, 2010. Serologic survey of hantavirus infection, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 16: 889–891.
24. Travassos da Rosa ES, Sampaio de Lemos ER, de Almeida Medeiros DB, Simith DB, de Souza Pereira A, Elkhoury MR, Mendes WS, Vidigal JR, de Oliveira RC, D'Andrea PS, Bonvicino CR, Cruz AC, Nunes MR, da Costa Vasconcelos PF, 2010. Hantaviruses and hantavirus pulmonary syndrome, Maranhao, Brazil. *Emerg Infect Dis* 16: 1952–1955.
25. Campos GM, Moro de Sousa RL, Badra SJ, Pane C, Gomes UA, Figueiredo LT, 2003. Serological survey of hantavirus in Jardimopolis County, Brazil. *J Med Virol* 71: 417–422.
26. Goodin DG, Paige R, Owen RD, Ghimire K, Koch DE, Chu YK, Jonsson CB, 2009. Microhabitat characteristics of Akodon montensis, a reservoir for hantavirus, and hantavirus seroprevalence in an Atlantic forest site in eastern Paraguay. *J Vector Ecol* 34: 104–113.
27. Mills JN, Yates TL, Ksiazek TG, Peters CJ, Childs JE, 1999. Long-term studies of hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: rationale, potential, and methods. *Emerg Infect Dis* 5: 95–101.
28. Heyman P, Vaheri A, Lundkvist A, Avsic-Zupanc T, 2009. Hantavirus infections in Europe: from virus carriers to a major public-health problem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7: 205–217.
29. Butler JC, Peters CJ, 1994. Hantaviruses and hantavirus pulmonary syndrome. *Clin Infect Dis* 19: 387–394, quiz 395.
30. McCaughey C, Hart C, 2000. Hantaviruses. *J Med Microbiol* 47: 587–599.
31. Klempa B, 2009. Hantaviruses and climate change. *Clin Microbiol Infect* 15: 518–523.
32. Suzan G, Marce E, Giermakowski JT, Armien B, Pascale J, Mills J, Ceballos G, Gomez A, Aguirre AA, Salazar-Bravo J, Armien A, Parmenter R, Yates T, 2008. The effect of habitat fragmentation and species diversity loss on hantavirus prevalence in Panama. *Ann N Y Acad Sci* 1149: 80–83.

## CAPÍTULO 2

### **Ecologia de populações de roedores silvestres e dinâmica temporal de infecção por hantavírus, no município de General Carneiro, sul do Estado do Paraná**

Este capítulo está apresentado em forma de artigo científico, aceito para publicação no periódico *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (Fator de impacto 2,59). Neste artigo é apresentado um estudo correlacional de 2 anos, realizado no município de General Carneiro, associando-se a flutuação populacional, atividade reprodutiva e estrutura etária dos roedores à prevalência de infecção por hantavírus nestas espécies. A área de estudo foi determinada a partir do levantamento de espécies apresentado no capítulo 1 e foi escolhida por apresentar um perfil diferenciado de infecção em roedores hospedeiros, com a ocorrência de *spillovers* além das associações vírus-hospedeiro já conhecidas. Neste artigo são discutidas também a ocorrência de infecções *spillover* ao longo do período de estudo e sua importância para a manutenção dos genótipos virais encontrados, além da associação das informações geradas de caráter ecológico ao perfil epidemiológico de SPH na área de estudo. A maioria dos estudos de hantavírus no Brasil são pontuais, em geral com coletas únicas, portanto a execução deste projeto possibilitou o conhecimento da dinâmica temporal de infecção por hantavírus em roedores hospedeiros em uma área de ocorrência de SPH.

Os objetivos específicos deste capítulo são:

- 1) Determinar a variação estacional dos tamanhos populacionais, condição reprodutiva e estrutura etária dos pequenos mamíferos do município de General Carneiro.
- 2) Determinar as prevalências de infecção por hantavírus, sua variação estacional e o genótipo viral associado a cada espécie de roedores silvestres.

As hipóteses relacionadas a estes objetivos são:

1) Premissa: O tamanho, condição reprodutiva e estrutura etária das populações de pequenos mamíferos variam conforme a estacionalidade. Hipótese: picos de reprodução ocorrem nos meses mais quentes e maiores tamanhos populacionais ocorrem nos meses mais frios devido ao recrutamento de indivíduos jovens.

2) Premissa: As prevalências de infecção por hantavírus entre os roedores silvestres variam conforme o sexo e a estrutura etária. Hipótese: maiores prevalências de infecção ocorrem em roedores machos adultos.



**Population ecology of hantavirus rodent hosts in Southern Brazil**

Journal:	<i>American Journal of Tropical Medicine &amp; Hygiene</i>
Manuscript ID:	AJTMH-13-0465.R1
Manuscript Type:	Original Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Teixeira, Bernardo; Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios; Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária</p> <p>Loureiro, Nathalie; Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios</p> <p>Strecht, Liana; Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Laboratório de Hantavíruses e Rickettsioses</p> <p>Gentile, Rosana; Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios</p> <p>de Oliveira, Renata; Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Hantavíruses e Rickettsioses</p> <p>Guterres, Alexandre; Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Hantavíruses e Rickettsioses</p> <p>Fernandes, Jorlan; Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Hantavíruses e Rickettsioses</p> <p>Mattos, Luciana Helena; Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Hantavíruses e Rickettsioses</p> <p>Raboni, Sonia; Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ/PR</p> <p>Rubio, Giselia; Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, Divisão de Zoonoses e Intoxicações</p> <p>Bonvicino, Cibele; Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios; Instituto Nacional de Câncer, Divisão de Genética</p> <p>Duarte dos Santos, Claudia; Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ/PR</p> <p>de Lemos, Elba; Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Hantavíruses e Rickettsioses</p> <p>D'Andrea, Paulo; Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios</p>
Key Words:	Hantaviruses, Ecology/Natural History, Zoonotic Diseases

## Population ecology of hantavirus rodent hosts in Southern Brazil

Bernardo R. Teixeira, Nathalie Loureiro, Liana Strecht, Rosana Gentile, Renata C. Oliveira, Alexandro Guterres, Jorlan Fernandes, Luciana H. B. V. Mattos, Sonia M. Raboni, Giselia Rubio, Cibele R. Bonvicino, Claudia N. Duarte dos Santos, Elba R. S. Lemos and Paulo S. D'Andrea

*Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; Laboratório de Hantaviruses e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Paraná, Brazil; Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, Paraná, Brazil; Divisão de Genética, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil*

### ABSTRACT

In this study we analyze population dynamics of hantavirus rodent hosts and prevalence of infection over a two year period in Southern Brazil, a region with a high incidence of hantavirus pulmonary syndrome. The 14 small mammal species captured were composed of 10 rodents and 4 marsupials, the six most abundant species being *Akodon serrensis*, *Oxymycterus judex*, *Akodon montensis*, *Akodon paranaensis*, *Oligoryzomys nigripes* and *Thaptomys nigrita*. These species displayed a similar pattern with increasing population sizes in fall/winter due to recruitment and both, increase in reproductive activity and higher hantavirus prevalence in spring/summer. Specific associations between *A. montensis*/Jaborá Virus (JABV) and *O. nigripes*/Juquitiba-like Virus (JUQV-like) were established as well as spillover infections between *A. paranaensis*/JABV, *A. serrensis*/JABV and *A. paranaensis*/JUQV-like. Spillover infection in secondary hosts seems to play an important role in maintaining JABV and JUQV-like in the hantavirus sylvatic cycle mainly during periods of low prevalence in primary hosts.

### INTRODUCTION

Hantavirus pulmonary syndrome (HPS) in Brazil is a zoonosis usually associated with rural activities in disturbed environments or in sylvatic interface areas.<sup>1,2</sup> Since the first HPS case in 1993, more than 1600 cases have been confirmed in Brazil, distributed among all regions, mainly in the southern states of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul.<sup>3</sup> The

State of Paraná is the fourth in HPS occurrence with two hantavirus genotypes described, Araucaria Virus (ARAUV) and Jaborá Virus (JABV).<sup>4-6</sup> Since Araucaria Virus is recognized as a Jucituba-like Virus (JUQV-like), we adopt this nomenclature herein to report this hantavirus genotype.

So far, five hantavirus genotypes associated to HPS cases have been described in rodent hosts and humans in many Brazilian regions: 1) Jucituba Virus (JUQV) distributed in the Atlantic Forest in the South and Southeastern regions, the host being *Oligoryzomys nigripes*,<sup>4,7</sup> with seroprevalence of 2.5-18.3%,<sup>6-9</sup> 2) Araraquara Virus (ARAV) with a wide distribution in the Cerrado Biome (Central plateau and Southeastern), transmitted by *Necromys lasiurus*,<sup>7</sup> with seroprevalence of 1.2-11%,<sup>7,10-12</sup> 3) Laguna Negra-like Virus (LNV) from a transition area of Cerrado and Amazon, restricted until now to Mato Grosso State in Northwestern Brazil, associated to *Calomys callidus*,<sup>13,14</sup> with a seroprevalence of 17.4%,<sup>13</sup> 4) Castelo dos Sonhos Virus (CASV) from North and Northwestern Brazil in the Amazonian State of Pará, and in a transition area with Cerrado in the State of Mato Grosso, harbored by *Oligoryzomys utiaritensis*<sup>15-17</sup>, with seroprevalence of 4.5%<sup>16</sup> and 5) Anajatuba Virus (ANAJV) from lowland areas of the Amazon Forest Biome in the Northeastern State of Maranhão, transmitted by *Oligoryzomys fornesi* with seroprevalence of 41.7%.<sup>18</sup> Another four genotypes were described only in rodents without any human infection reported: 1) Seoul Virus (SEOV) associated with the sinanthropic species *Rattus norvegicus*<sup>19,20</sup> in the Amazonian State of Pará in Northern Brazil, 2) Rio Mearim Virus (RIMEV) from the lowlands of the Amazon Forest, sympatric to ANAJV in Northeastern Brazil, whose host is *Holochilus sciureus*, with seroprevalence of 29.4%<sup>18</sup>, 3) Rio Mamore Virus (RMV) from North Brazil in the Amazon Forest, whose host is *Oligoryzomys microtis*<sup>21</sup> and 4) Jaborá Virus (JABV) distributed in the Atlantic Forest from the Southern region harbored by *Akodon montensis* with seroprevalence of 14.5%.<sup>9</sup> However, SEOV and RMV have also been associated with human infection in other countries.<sup>22,23</sup>

Five of these nine genotypes are also present in rodent hosts from other South American regions: 1) JUQV in Paraguay,<sup>24</sup> Argentina<sup>25</sup> and Uruguay<sup>26</sup> with seroprevalence of 3.2 - 11.9% in *O. nigripes*<sup>25,26</sup> and 6% in *Oxymycterus* sp.,<sup>26</sup> 2) LNV in Paraguay,<sup>24,27</sup> Bolivia<sup>28</sup> and Argentina,<sup>29</sup> with seroprevalence of 5.1-8.1% in *C. callosus*<sup>28,29</sup> and 23% in *C. laucha*,<sup>30</sup> 3) RMV in Bolivia<sup>28,31,32</sup> and Peru<sup>33</sup> with seroprevalence of 7.7% in *O. microtis*,<sup>28</sup> 4) JABV in Paraguay<sup>24</sup> and 5) SEOV distributed worldwide.

Despite the general rule of specificity between hantavirus genotypes and rodent host species, an increasing number of studies have reported hantavirus spillover into secondary

hosts.<sup>34</sup> However, little information about natural history of spillover infection on the host population dynamics is available. South American hantavirus genotypes do not correspond with the same level of co-evolution in studies with hantaviruses in Europe and Asia, thus affording great potential for host switching and adaptation<sup>35</sup>. In Brazil, spillover has been witnessed in many hantavirus genotypes and host species, like ARAV harbored by secondary hosts, as *A. montensis*, *O. nigripes*, *Thaptomys nigrita* and *Juliomys* sp.<sup>36,37</sup> as well as species of marsupials and bats.<sup>38</sup> Also, JUQV-like and JABV have been reported in secondary hosts in Southern Brazil, JUQV-like associated with *Akodon paranaensis*,<sup>6</sup> *A. montensis* and *Oxymycterus judex*,<sup>5</sup> and JABV with *Akodon serrensis*<sup>6</sup> and *A. paranaensis*.<sup>39</sup>

Studies of small mammals have clarified many aspects on population ecology of Brazilian rodents, mainly in the Atlantic Forest.<sup>40-49</sup> Notwithstanding the great diversity of rodents in Brazil (about 240 species),<sup>50,51</sup> consequently providing a high potential for many new hantavirus hosts, no studies have considered the infection dynamics. Population ecology studies are crucial for understanding the temporal patterns of infection in host populations as well as furnishing data on epidemiology, outbreak prediction and risk of human infection.<sup>52-60</sup>

In this study we analyze population dynamics of hantaviruses in wild rodent hosts and prevalence of infection over a two year period from 12/2009 to 12/2011 in General Carneiro municipality, State of Parana, Southern Brazil. This municipality has a high incidence of HPS, mainly affecting rural workers of pine tree management. This region also is inhabited by infected rodents with spillover infection of JUQV-like and JABV genotypes.<sup>5,6</sup>

## MATERIALS AND METHODS

### *Field data: study area and small mammal sampling*

The fieldwork was conducted in General Carneiro municipality, State of Paraná, Southern Brazil (Figure 1), located in a Mixed Ombrophilous Forest region. We studied different vegetation types, including native forests of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze 1898, native forest with anthropic disturbance and exotic pine tree reforestation areas (*Pinus elliotti* and *Pinus taeda*) for timber trade.

The climate is humid subtropical (Cfa), according to the Köppen climate classification, with mild summers and cold winters, without dry seasons.<sup>61</sup> The Technological Institute SIMEPAR provided monthly data of average temperature and accumulated rainfall

from December/2009 to December/2011 obtained from Palmas Station, Paraná (Figure 2), the closest and most representative weather station in proximity to General Carneiro municipality.

Rodent sampling was conducted every three months from December 2009 to December 2011, during five consecutive nights for each of the nine capture sessions. All capture sessions took place at the end of each season as follows: December in late Spring, March in late Summer, June in late Fall and September in late Winter. The capture effort was constant in all capture sessions. We established twelve transects with 20 capture stations setting Tomahawk<sup>®</sup> (40.64x12.70x12.70 cm) and Sherman<sup>®</sup> (7.62x9.53x30.48 cm) traps, 300 traps in each capture night, baited with a mixture of bacon, peanut butter, banana and oatmeal.

Specimens were captured, anesthetized and euthanased according to recommended safety procedures<sup>62</sup> and under the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, Oswaldo Cruz Foundation, Brazil (FIOCRUZ, License number L-049/08). Animals were captured with authorization of the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBIO Authorization 13373). Specimens were then measured, weighed, sexed and identified by both karyotyping<sup>63,64</sup> and cranial morphology/morphometry. Hantavirus antibody-positive specimens were confirmed by molecular analysis (amplification of the cytochrome *b* gene).

#### *Hantavirus infection analysis*

Serum and tissue samples were obtained from all small mammals captured and submitted to IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of hantavirus antibodies with the N-Araraquara hantavirus recombinant nucleocapsid protein.<sup>65</sup> Samples of December 2009 and March 2010 captures were also tested by Hantec Kit.<sup>66</sup> Total RNA was extracted from lung, liver or kidney tissue samples of hantavirus antibody-positive rodent species with the PureLink Micro-to-Midi total RNA Purification Kit (Invitrogen, San Diego, CA). The rodent samples were analyzed using the polymerase chain reaction with reverse transcription (750bp) and nested reactions (478bp) of the S segment, with primers AG04-25F (5' TAGTAGACTCCTTGAKAAGCT 3'), AG733-752R (5' GAYTGGATGGAAAGGATWGA 3') and AG274-291F (5' CCCTGTTGGATCAACTGG 3').<sup>39,67</sup> For purification we adopted Wizard<sup>®</sup>SV Gel and the PCR Clean-Up System kit (Promega, Corp., Madison, WI, USA) and for sequencing the BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Virus sequences were analyzed with MEGA5



software, and hantavirus genotypes were identified with BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) through comparison with other hantavirus sequences.<sup>68,69</sup>

### *Data Analysis and Seasonal Patterns*

Population size, reproductive status of females and age structure were analyzed by species and year/season. Population size was estimated as the absolute number of captured specimens over a constant trapping effort. Lactating and pregnant females were considered as reproductively active. Females were classified as mated or unmated by uterus analysis, thus females with tumescence and marks of previous pregnancy were classified as non-virgins. Frequency of reproductively active females of the total number of mated females in each capture session was calculated to determine reproductive season. Total sex ratio of each species was tested in the expected 1:1, with a chi-square analysis. Age structures were based on body weight (grams), dividing individuals into three classes with approximately the same number of animals.<sup>54</sup>

We recorded the presence of wounds and scars on the tail or ear as indicative of antagonistic encounters, the main form of hantavirus transmission among rodents.<sup>70</sup> Prevalence of infection was calculated for each species, regarding sex, age class, number of specimens and capture season. The chi-square test with Yates correction was adopted to test the association with these data.

Influence of monthly rainfall, average monthly temperature and reproducing females in population sizes was analyzed by multiple linear regression considering backward criterion for a one, two and three month time lag. Population sizes were also included in this analysis to verify influence of these variables on prevalence.

## RESULTS

### *Population Analysis and Seasonal Patterns*

The 14 small mammal species consisted of 10 rodents [Rodentia, Sigmodontinae: *Akodon serrensis* (n = 401); *Oxymycterus judex* (n = 294); *Akodon montensis* (n = 253); *Akodon paranaensis* (n = 87); *Oligoryzomys nigripes* (n = 73); *Thaptomys nigrita* (n = 70); *Sooretamys angouya* (n = 13); *Delomys dorsalis* (n = 2); *Nectomys squamipes* (n = 2) and *Brucepattersonius iheringi* (n = 2)] and 4 marsupials [Didelphimorphia, Didelphidae:

*Monodelphis dimidiata* (n = 34); *Philander frenatus* (n = 9); *Gracilinanus* sp. (n = 5) and *Lutreolina crassicaudata* (n = 1)].

Population dynamics and prevalence were analyzed for *A. serrensis*, *O. judex*, *A. montensis*, *A. paranaensis*, *O. nigripes* and *T. nigrita*, the six most abundant species. All species displayed similar seasonal patterns of population sizes, with higher values during the cooler months (from June to September) (Figure 3). This pattern was emphasized by *A. serrensis*, *A. montensis*, *O. nigripes*, *T. nigrita* and *A. paranaensis*, this latter species still maintaining higher population values until December 2010. *O. judex* presented a quite different pattern, with more homogeneous population sizes and less marked peaks (Figure 3).

All six species exhibited a reproductive pattern with higher reproductive frequency during the warmer months (from December to March) (Figure 3). *Akodon serrensis* and *A. montensis* also reproduced in June and September although at lower rates. *Oxymycterus judex* presented a reproduction activity with similar rates throughout the year in accordance with population size dynamics data.

Age classes were based on weight. *A. serrensis* males (♂) and females (♀) were divided into Class I (11--22 g), Class II (23--26 g) and Class III (27--40 g for ♂ and 27--45 g for ♀), *A. montensis* Class I (7--25 g ♂ and 8--21 g ♀), Class II (26--31 g ♂ and 22--28 g ♀) and Class III (32--49 g ♂ and 29--44 g ♀), *A. paranaensis* Class I (14--31 g ♂ and 17--25 g ♀), Class II (32--41 g ♂ and 26--34 g ♀) and Class III (44--61 g ♂ and 35--48 g ♀), *O. judex* Class I (22--82 g ♂ and 34--69 g ♀), Class II (83--110 g ♂ and 70--87 g ♀) and Class III (111--160 g ♂ and 88--140 g ♀), *O. nigripes* Class I (10--20 g ♂ and 9--15 g ♀), Class II (21--25 g ♂ and 16--19 g ♀) and Class III (26--37 g ♂ and 20--31 g ♀) and *T. nigrita* Class I (11--17 g ♂ and 11--15 g ♀), Class II (18--20 g ♂ and 16--20 g ♀) and Class III (21--27 g ♂ and 21--24 g ♀).

A high frequency of young individuals (class I and II) was observed during the cooler months (from June to September). This pattern was conspicuous mainly in *A. serrensis* and *A. montensis* (Figure 4). Adults (class III) presented a more homogeneous distribution throughout the year as expected due to population aging. However, peaks of higher adult abundance were evident during the breeding season (December to March).

Five of the six most abundant species presented male sex bias: *A. serrensis* ( $\chi^2 = 4.611$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.0360$ ), *A. montensis* ( $\chi^2 = 4.271$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.0451$ ), *A. paranaensis* ( $\chi^2 = 4.545$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.0428$ ), *O. judex* ( $\chi^2 = 9.918$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.002$ ) and *T. nigrita* ( $\chi^2 = 4.629$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.0422$ ).

We observed an inverse relationship between temperature and population sizes in *A. serrensis*, *A. montensis*, *O. nigripes* and *O. judex* with a one month time lag ( $R^2 = 0.552$ ,  $\beta = -0.743$ ,  $p = 0.022$ ;  $R^2 = 0.580$ ,  $\beta = -0.762$ ,  $p = 0.017$ ;  $R^2 = 0.748$ ,  $\beta = -0.865$ ,  $p = 0.003$ ;  $R^2 = 0.532$ ,  $\beta = -0.729$ ,  $p = 0.026$ , respectively), in *A. paranaensis* with a one and two month time lag ( $R^2 = 0.630$ ,  $\beta = -0.793$ ,  $p = 0.011$ ;  $R^2 = 0.708$ ,  $\beta = -0.841$ ,  $p = 0.004$  respectively) and in *T. nigrita* with a two and three month time lag ( $R^2 = 0.829$ ,  $\beta = -0.910$ ,  $p = 0.001$ ;  $R^2 = 0.874$ ,  $\beta = -0.768$ ,  $p = 0.002$ , respectively). There was also an inverse relationship between rainfall and *T. nigrita* population size with a three month time lag ( $R^2 = 0.874$ ,  $\beta = -0.378$ ,  $p = 0.045$ ). There was no significant influence of reproductive activity on population sizes whatsoever.

### *Hantavirus infection*

We screened 26 hantavirus-infected rodents (ELISA and PCR confirmed) (Table 1), proving statistically biased to males ( $\chi^2 = 7.3$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0.0121$ ). Two hantavirus genotypes were confirmed, establishing between a 95--99% identity with deposited sequences: i) Jaborá Virus (JABV) in *A. montensis*, *A. serrensis* and *A. paranaensis* and ii) Juquitiba-like Virus (JUQV-like) in *O. nigripes* and *A. paranaensis*. The other species, *O. judex*, *T. nigrita*, *S. angouya*, *D. dorsalis*, *N. squamipes* and *B. iheringi* were not diagnosed seropositive.

Infection by JABV was apparent throughout the year with peaks during the warmer months (December-March), especially in *A. montensis*, which rendered infected specimens in eight of the nine trap sessions. Only four animals presented JUQV-like infection (Table 1) in four different capture sessions, consequently the prevalence of JUQV-like species corresponded always to only one infected animal in each capture session (Figure 3). Likewise JABV, JUQV-like also had a similar pattern, with infection in warmer months (Figure 3e). *Akodon paranaensis* was the only species that harbored two hantavirus genotypes, JUQV-like (March 2010) and JABV (December 2010 and June 2011).

The majority of the infected animals belonged to class III ( $n = 23$ ;  $\chi^2 = 32.462$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0.0001$ ), two to class II (one *A. montensis* and one *A. paranaensis*) and only one to class I (one *O. nigripes*). The scar analysis revealed that 60% of all infected *A. montensis* had ear/tail scars, expressing a significant relationship between infection and scars ( $\chi^2 = 9.192$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.0063$ ). No significant influence of temperature, precipitation, population size and reproductive activity on prevalence of *A. montensis* (the only species with sufficient data for this analysis) was evident.

## DISCUSSION

The six most abundant species displayed similar patterns of population dynamics, with increasing population sizes in fall/winter (June to September) and increasing reproductive activity in spring/summer (December to March), although reproductive activity throughout the year was confirmed for *A. serrensis*, *A. montensis* and *O. judex*. Climate analysis demonstrated the influence of the low temperature periods on population sizes, with population increase in cooler months probably related to food availability, mainly seed production of the Brazilian Pine, *A. angustifolia*. Some authors reported the availability of mature seeds on the forest floor during fall and winter in other areas of Mixed Ombrophilous forest<sup>46</sup> and also associated this high seed production to rodent population increases.<sup>45</sup> Other studies have also reported *A. angustifolia* seeds as an important food source in the diet of these rodent species.<sup>71-73</sup> In fact, we found a great amount of *A. angustifolia* seeds on the forest floor of the studied areas during late fall, many of which with rodent gnaw marks.

During the spring/summer more individuals of age class III were apparent, which is in agreement with the reproductive results, since reproductive activity occurs mainly in this age class. Likewise, in the fall/winter, we observed predominance of individuals of age class I, indicating that the population increase is due to the younger individual recruitment. These population dynamics patterns agree with other studies on Sigmodontinae ecology in both Atlantic Forest landscape types, Mixed Ombrophilous Forest<sup>45,48,49</sup> and Dense Ombrophilous Forest.<sup>44,47,74,75</sup>

Hantavirus exhibited a seasonal pattern with higher prevalence in spring/summer, when population sizes were lower and both reproductive activity as well as numbers of adults were higher. This pattern was also witnessed for other hantavirus genotypes in North<sup>52,56</sup> and South America<sup>54,55,59</sup>.

Hantavirus transmission among rodents is largely accepted as a consequence of bites and inoculation of the virus from the saliva, which contains higher levels of viral RNA than urine.<sup>76</sup> This transmission occurs in antagonistic encounters and many authors have determined the presence of scars as indicative of this behavior.<sup>10,70,77,78</sup> Aggressive encounters occur mainly in breeding season<sup>79</sup> and are more frequent in adult males.<sup>52,54,56,58,59</sup> Our results corroborated these postulations, with higher hantavirus prevalence found in spring/summer, seasons with higher reproductive activity and higher prevalence of infection in males of age class III (adults), with correlation between presence of scars and hantavirus infection.

Besides antagonistic encounters, inhalation of contaminated aerosols and ingestion of contaminated shared food source might be important modes of transmission among hosts.<sup>76</sup> Although *A. paranaensis* is not so dependent as *O. nigripes* on *A. angustifolia* seeds, this is an important alternative food source in cooler months, when others decrease. Both species also possessed a trophic niche overlap in the seasons without the *A. angustifolia* seeds (Perini AA, unpublished data). Besides the common consumption of *A. angustifolia* seeds, other food sources such as fruits, seeds and invertebrates are also shared by *Akodon montensis* and *O. nigripes*.<sup>80</sup> Thus, the oral route by mutual food source intake may also be contributing to both intraspecific and spillover transmissions in the study area.

In addition to the already established host-parasite specific interactions between *A. montensis*/JABV<sup>9</sup> and *O. nigripes*/JUQV<sup>7</sup>, we also observed spillover associations between *A. paranaensis*/JABV, *A. serrensis*/JABV and *A. paranaensis*/JUQV-like. In previous studies in General Carneiro municipality, we first presented these two latter associations<sup>6</sup> as well as spillover infections in *A. montensis* and *O. judex*, both infected by JUQV-like.<sup>5</sup> During this two-year study, only one in five *A. paranaensis* was infected by JUQV-like. Furthermore, no spillover was observed in *A. montensis* and *O. judex*. Considering the low frequency, we cannot confirm the importance of spillover on JUQV-like maintenance in the wild. However, the occurrence of JUQV-like infection in three different genera of secondary hosts suggested the adaptation of this genotype to genetically distinct rodent species. This scenario could be a determinant to establish both hantavirus genetic diversity<sup>81</sup> as well as the evolution of new hantavirus genotypes.<sup>2</sup> Also, in low prevalence times in the primary host, spillover infection can be very important in maintaining the virus in the wild until spillback infection<sup>2</sup>, as was likely the case for JUQV-like spillover in *A. paranaensis*, which took place in a month without *O. nigripes* (primary host) infection.

We also attested to low relative abundance and disruptions in the population dynamics of *O. nigripes*, with absence of animals on December 2009 and December 2011 capture sessions, a pattern observed in other Atlantic Forest areas.<sup>47,75</sup> Probably, this low abundance and instability on *O. nigripes* populations are playing an important role to keep JUQV-like at low frequency.

Spillover infections of JABV seem to be restricted to the three *Akodon* species. We can speculate that JABV was harbored by the common ancestor of these species and remained associated with them, a fact also discussed for spillover infections between *Calomys laucha* and *Calomys callosus*, hosts of LNV in Paraguay.<sup>28</sup> However, the geographic distribution of these *Calomys* species does not overlap, unlike *A. montensis*, *A. serrensis* and *A. paranaensis*

which occurred in sympatry in our studied area, a pattern also reported for three *Reithrodontomys* species hosts of Rio Segundo Virus (RSV) in Panama.<sup>82</sup> Thus, infection of *A. serrensis* and *A. paranaensis* by JABV may be related to overlap in habitat and food sharing.

Despite the low frequency of spillover infection in *A. serrensis*, there were JABV infections in all sampling months (regardless of host species) and a high prevalence of infection in the secondary host, *A. paranaensis*. Moreover, the spillover *A. paranaensis*/JABV was also reported in another area of the Mixed Ombrophilous Forest<sup>39</sup> emphasizing the importance of this species in maintaining JABV. As in JUQV-like, JABV spillover infections seem to be important during periods of low viral prevalence in the primary host, since all spillover infections occurred in months of low *A. montensis* infection.

JUQV-like is the genotype related to HPS cases in South and Southeastern Brazil.<sup>7,83,84</sup> Hitherto, no studies have related JABV to HPS, even in endemic areas. HPS cases in General Carneiro municipality appeared every year from 1999 to 2006, but no cases were reported from 2007 to 2011, probably due to epidemiological vigilance by the Health Division of the State of Paraná (SESA-PR). The main labor activity related to human infection in General Carneiro municipality was Pine Tree (*Pinus elliotti* and *Pinus taeda*) management.<sup>83,85</sup> Pine tree workers usually occupied precarious, temporary structures near management areas, storing food, and thus, attracting wild rodents, mainly the habitat generalist species *O. nigripes*,<sup>85</sup> thereby increasing probability of exposure to JUQV-like. From 2001, these precarious structures were modified in order to prevent wild rodent invasion. This resulted in a gradual decrease of HPS cases in the General Carneiro municipality (Health Division of State of Parana, unpublished data).

Another explanation for the absence of HPS cases may be related to a possible change in hantavirus transmission patterns among rodents, since in the current study (2009--2011) we detected a higher prevalence of JABV (84.6% JABV and 15.4% JUQV-like), while in the previous study (2006), where HPS cases were reported, the prevalence of JUQV-like was higher (66.6%).<sup>5</sup> So, we point out that epidemiological vigilance and the low frequency of JUQV-like infection in rodents in the current study may be correlated to the absence of HPS cases in this period.

The results described here reinforce the importance of pluri-annual studies on hantavirus infection dynamics in rodent hosts. We observed a clear pattern of higher hantavirus prevalence in seasons with higher reproductive activity, greater numbers of adults

and lower population size. Increases in population occurred in cooler months with higher numbers of younger animals in accordance with resource availability.

Spillover infection reported in this study and in our previous study<sup>5</sup> allows us to speculate that this host-virus association is common in this area. Therefore, we can infer that the spillover infection on secondary hosts plays an important role in maintaining JABV and JUQV-like in the hantavirus sylvatic cycle until the spillback infection for primary hosts.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Health Secretary of the State of Paraná and the technicians Edson dos Santos, Edilsom Semczuk (Health Secretary of Foz do Iguaçu municipality), Ricardo Matsuo, Joel Lopes, Luiz Eduardo Pereira, Elizeu da Silva, Jorge Pinto (FIOCRUZ) and Jorge da Paixão (FIOCRUZ) for their assistance in the fieldwork expeditions. We are also grateful to Health Secretary of General Carneiro municipality and Pizzatto Industries for assisting in the rodent trapping logistics and Technological Institute SIMEPAR for climatic data. We thank Dr. Fabiano Araújo Fernandes, BSc. Carolina Valença and Dra. Fabiana Pellegrini Caramaschi for assistance in small mammal specific identification. English review and revision by Prof. Mitchell Raymond Lishon, native of Chicago, Illinois, USA-UCLA 1969.

#### FINANCIAL SUPPORT

FIOCRUZ, PAPER V-CNPq/FIOCRUZ (403637/2008-2), CAPES (fellowship recipient for BRT), CNPq (fellowship recipient for SMR, CRB, CNDS, ERS� and PSD) and FAPERJ (fellowship recipient for CRB and PSD).

#### AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

The authors declare “No competing financial interests exist”.

#### AUTHORS' ADDRESSES

Bernardo R. Teixeira, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, Av. Brasil, 4365, Mangueiras, Zip Code: 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil and Programa de Pós-Graduação em Biologia

Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, E-mail: [bernardoteixeira@gmail.com](mailto:bernardoteixeira@gmail.com). Nathalie Loureiro, Rosana Gentile and Paulo S. D'Andrea, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, E-mails: [nathalie.loureiro@gmail.com](mailto:nathalie.loureiro@gmail.com), [rgentile@ioc.fiocruz.br](mailto:rgentile@ioc.fiocruz.br) and [dandrea@ioc.fiocruz.br](mailto:dandrea@ioc.fiocruz.br). Liana Strecht, Renata C. Oliveira, Alexandro Guterres, Jorlan Fernandes, Luciana H. B. V. Mattos and Elba R. S. Lemos, Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, E-mails: [lstrecht@ioc.fiocruz.br](mailto:lstrecht@ioc.fiocruz.br), [reoliveira@ioc.fiocruz.br](mailto:reoliveira@ioc.fiocruz.br), [guterres@ioc.fiocruz.br](mailto:guterres@ioc.fiocruz.br), [jorlan@ioc.fiocruz.br](mailto:jorlan@ioc.fiocruz.br), [lucianah@ioc.fiocruz.br](mailto:lucianah@ioc.fiocruz.br) and [elemos@ioc.fiocruz.br](mailto:elemos@ioc.fiocruz.br). Sonia M. Raboni and Cláudia N. Duarte dos Santos, Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775 – CIC. Zip Code: 81350-010, Curitiba, Paraná, Brazil, E-mails: [sraboni@ufpr.br](mailto:sraboni@ufpr.br) and [clsantos@tecpar.br](mailto:clsantos@tecpar.br). Giselia Rubio, Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, Divisão de Zoonoses e Intoxicações, Rua Piquiri, 170, Zip Code: 80.230-140, Curitiba, Paraná, Brazil, E-mail: [giseliarubio@sesa.pr.gov.br](mailto:giseliarubio@sesa.pr.gov.br). Cibele R. Bonvicino, Divisão de Genética, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcante, 37, Zip Code: 20231-050, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, E-mail: [cibelerb@inca.gov.br](mailto:cibelerb@inca.gov.br).

#### CORRESPONDING AUTHORS

Paulo Sérgio D'Andrea and Bernardo R. Teixeira. Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ - Av. Brasil, 4365, Manguinhos, CEP: 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Telephone: +55 21 2562-1325. E-mails: [dandrea@ioc.fiocruz.br](mailto:dandrea@ioc.fiocruz.br) and [bernardoteixeira@gmail.com](mailto:bernardoteixeira@gmail.com)

#### REFERENCES

1. Lednicky JA, 2003. Hantaviruses: A Short Review. *Arch Pathol Lab Med* 127(1): 30–35.
2. Jonsson CB, Figueiredo LTM, Vapalahti O, 2010. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev* 23(2): 412–441.
3. Brazilian Ministry of Health, 2013. *Report on Hantavirus Pulmonary Syndrome until may, 2013*. Available at: [http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jun/21/ANEXO HANTA\(2\).pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jun/21/ANEXO HANTA(2).pdf).



4. Raboni SM, Probst CM, Bordignon J, Zeferino A, Duarte dos Santos CN, 2005. Hantaviruses in Central South America: phylogenetic analysis of the S segment from HPS cases in Paraná, Brazil. *J Med Virol* 76(4): 553–562.
5. Raboni SM, Hoffmann FG, Oliveira RC, Teixeira BR, Bonvicino CR, Stella V, Carstensen S, Bordignon J, D’Andrea PS, Lemos ERS, Duarte dos Santos CN, 2009. Phylogenetic characterization of hantaviruses from wild rodents and hantavirus pulmonary syndrome cases in the State of Parana (Southern Brazil). *J Gen Virol* 90: 2166–2171.
6. Raboni SM, Delfraro A, de Borba L, Teixeira BR, Stella V, Araujo MR, Carstensen S, Rubio G, Maron A, Lemos ERS, D’Andrea PS, Duarte dos Santos CN, 2012. Hantavirus infection prevalence in wild rodents and human anti-hantavirus serological profiles from different geographic areas of South Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 87(2): 371–378.
7. Suzuki A, Bisordi I, Levis S, Garcia J, Pereira LE, Souza RP, Sugahara TKN, Pini N, Enria D, Souza LTM, 2004. Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil. *Emerg Infect Dis* 10(12): 2127–2134.
8. Oliveira RC, Teixeira BR, Mello FCA, Pereira AP, Duarte AS, Bonaldo MC, Bonvicino CR, D’Andrea PS, Lemos ERS, 2009. Genetic characterization of a Jujuitiba-like viral lineage in *Oligoryzomys nigripes* in Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop* 112(2): 212–218.
9. Oliveira RC, Padula PJ, Gomes R, Martinez VP, Bellomo C, Bonvicino CR, Freire e Lima DI, Bragagnolo C, Caldas ACS, D’Andrea PS, Lemos ERS, 2011. Genetic characterization of hantaviruses associated with sigmodontine rodents in an endemic area for hantavirus pulmonary syndrome in Southern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11(3): 301–314.
10. Pereira LE, Suzuki A, Bisord I, Souza RP, Souza LTM, Oshiro FM, Cerroni M P, Neto RSA, Pinho JRR, 2007. Estudo longitudinal da prevalência dos Vírus Jujuitiba e Araraquara em roedores das regiões da Mata Atlântica e do Cerrado do Brasil. *Bol Epidemiol Paul* 4(42): 2–13.
11. Figueiredo GG, Borges AA, Campos GM, Machado AM, Saggiaro FP, Sabino Jr. GS, Badra SJ, Ortiz AAA, Figueiredo LTM, 2010. Diagnosis of hantavirus infection in humans and rodents in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 43(4): 348–354.
12. Limongi JE, Moreira FG, Peres JB, Suzuki A, Ferreira IB, Souza RP, Pinto RMC, Pereira LE, 2013. Serological survey of hantavirus in rodents in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 55(3): 155–158.

13. Rosa EST, Medeiros DBA, Nunes MRT, Simith DB, Pereira ADS, Elkhoury MR, Santos ED, Lavocat M, Marques AA, Via AVG, Kohl VA, Terças ACP, D'Andrea PS, Bonvicino CR, 2012. Molecular Epidemiology of Laguna Negra Virus, Mato Grosso State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 18(6): 982–985.
14. Raboni SM, de Borba L, Hoffmann FG, Noronha L, Azevedo MLV, Carstensen S, Mazarotto GACA, Bordignon J, Duarte dos Santos CN, 2009. Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of Brazil: Case report. *J Clin Virol* 45(2): 153–156.
15. Johnson AM, Souza LTM, Ferreira IB, Pereira LE, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ, Nichol ST, 1999. Genetic Investigation of Novel Hantaviruses Causing Fatal HPS in Brazil. *J Med Virol* 59: 527–535.
16. Rosa EST, Medeiros DBA, Nunes MRT, Simith DB, Pereira AS, Elkhoury MR, Lavocat M, Marques AAR, Via AV, D'Andrea PS, Bonvicino CR, Lemos ERS, Vasconcelos PFC, 2011. Pygmy rice rat as potential host of Castelo dos Sonhos Hantavirus. *Emerg Infect Dis* 17(8): 1527–1530.
17. Agrellos R, Bonvicino CR, Rosa EST, Marques AAR, D'Andrea PS, Weksler M, 2012. The taxonomic status of the Castelo dos Sonhos Hantavirus reservoir. *Zootaxa* 3220: 1–28.
18. Rosa EST, Mills JN, Padula PJ, Elkhoury MR, Ksiazek TG, Mendes WS, Santos ED, Araújo GCB, Martinez VP, Rosa JFST, Edelstein A, Vasconcelos PFC, 2005. Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5(1): 11–19.
19. Leduc JW, Smith GA, Pinheiro FP, Vasconcelos PFC, Rosa EST, Maiztegui JI, 1985. Isolation of a Hantaan-related virus from Brazilian rats and serologic evidence of its widespread distribution in South America. *Am J Trop Med Hyg* 34(4): 810–815.
20. Xiao S, Chu Y, Knauert FK, Lofts R, Dalrymple JM, Leduc JW, 1992. Comparison of hantavirus isolates using a genus-reactive primer pair polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 73: 567–573.
21. Firth C, Tokarz R, Simith DB, Nunes MRT, Bhat M, Rosa EST, Medeiros DB a, Palacios G, Vasconcelos PFC, Lipkin WI, 2012. Diversity and distribution of hantaviruses in South America. *J Virol* 86(24): 13756–13766.

22. Chan YC, Wong TW, Yap EH, 1987. Haemorrhagic fever with renal syndrome: clinical, virological and epidemiological perspectives. *Ann Acad Med Singapore* 16(4): 696–701.
23. Casapia M, Mamani E, Garcia MP, Miraval ML, Valencia P, Quino AH, Álvarez C, Donaires LF, 2012. Síndrome pulmonar por hantavirus (Virus Río Mamoré) en la Amazonía Peruana. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 29(3): 390–395.
24. Chu YK, Goodin D, Owen RD, Koch D, Jonsson CB, 2009. Sympatry of 2 Hantavirus Strains, Paraguay, 2003–2007. *Emerg Infect Dis* 15(12): 2007–2010.
25. Padula P, Martinez VP, Bellomo C, Maidana S, Juan JS, Tagliaferri P, Bargardi S, Vazquez C, Colucci N, Estévez J, Almirón M, 2007. Pathogenic Hantaviruses, Northeastern Argentina and Eastern Paraguay. *Emerg Infect Dis* 13(8): 1211–1214.
26. Delfraro A, Tomé L, D'Elía G, Clara M, Achával F, Russi JC, Rodonz JRA, 2008. Jujuitiba-like hantavirus from 2 nonrelated rodent species, Uruguay. *Emerg Infect Dis* 14(9): 1447–1451.
27. Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, Peters CJ, Nichol ST, 1997. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* 238(1): 115–127.
28. Carroll DS, Mills JN, Montgomery JM, Bausch DG, Blair PJ, Burans JP, Felices V, Gianella A, Iihoshi N, Nichol ST, Olson JG, Rogers DS, Salazar M, Ksiazek TG, 2005. Hantavirus pulmonary syndrome in Central Bolivia: relationships between reservoir hosts, habitats, and viral genotypes. *Am J Trop Med Hyg* 72(1): 42–46.
29. Levis S, Garcia J, Pini N, Calderón G, Ramírez J, Bravo D, St Jeor S, Ripoll C, Bego M, Lozano E, Barquez R, Ksiazek TG, Enria D, 2004. Hantavirus pulmonary syndrome in northwestern Argentina: circulation of Laguna Negra virus associated with *Calomys callosus*. *Am J Trop Med Hyg* 71(5): 658–63.
30. Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, Palma RE, Vera I, De Velasquez F, Baez E, Schmidt WE, Figueroa RE, Peters CJ, Zaki SR, Khan AS, Ksiazek TG, 1997. An Outbreak of Hantavirus Pulmonary Syndrome in Western Paraguay. *Am J Trop Med Hyg* 57(3): 274–282.
31. Hjelle BL, Torrez-Martinez N, Koster FT, 1996. Hantavirus pulmonary syndrome-related virus from Bolivia. *Lancet* 347(8993): 57.
32. Bharadwaj M, Boten J, Torrez-Martinez N, Hjelle BL, 1997. Rio Mamore Virus: Genetic characterization of a newly recognized Hantavirus of the Pygmy Rice Rat, *Oligoryzomys microtis*, from Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 57(3): 368–374.

33. Richter MH, Hanson JD, Cajimat MN, Milazzo ML, Fulhorst CF, 2010. Geographical range of Rio Mamoré virus (family Bunyaviridae, genus Hantavirus) in association with the small-eared pygmy rice rat (*Oligoryzomys microtis*). *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(6): 613–
34. Hjelle B, Torres-Pérez F, 2010. Hantaviruses in the Americas and Their Role as Emerging Pathogens. *Viruses* 2(12): 2559–2586.
35. Chu Y-K, Owen RD, Jonsson CB, 2011. Phylogenetic exploration of hantaviruses in Paraguay reveals reassortment and host switching in South America. *Virology* 418: 399.
36. Figueiredo LTM, Moreli ML, Sousa RLM de, Borges AA, Figueiredo GG, Machado AM, Bisordi I, Nagasse-Sugahara TK, Suzuki A, Pereira LE, Souza RP, Souza LTM, Braconi CT, Harsi CM, Zanotto PMA, 2009. Hantavirus Pulmonary Syndrome, Central Plateau, Southeastern, and Southern Brazil. *Emerg Infect Dis* 15(4): 561–567.
37. Araujo J, Pereira A, Nardi MS, Henriques DA, Lautenschlager DA, Dutra LM, Ometto TL, Hurtado RF, Maués F, Nava A, Morais FA, Aires CC, Favorito S, Durigon EL, 2011. Detection of hantaviruses in Brazilian rodents by SYBR-Green-based real-time RT-PCR. *Arch Virol* 156(7): 1269–1274.
38. Araujo J, Thomazelli LM, Henriques DA, Lautenschlager D, Ometto T, Dutra LM, Aires CC, Favorito S, Durigon EL, 2012. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. *BMC Res Notes* 5: 690.
39. Oliveira RC, Guterres A, Schrago CG, Fernandes J, Teixeira BR, Zeccer S, Bonvicino CR, D'Andrea PS, Lemos ERS, 2012. Detection of the first incidence of *Akodon paranaensis* naturally infected with the Jabora Virus strain (Hantavirus) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(3): 424–428.
40. Cerqueira R, Gentile R, Fernandez FAS, D'Andrea PS, 1993. A five-year population study of an assemblage of small mammals in Southeastern Brazil. *Mammalia* 57(4): 507–517.
41. D'Andrea PS, Gentile R, Cerqueira R, Grelle CE V, Horta C, Rey L, 1999. Ecology of small mammals in a Brazilian rural area. *Rev Bras Zool* 16(3): 611–620.
42. D'Andrea PS, Gentile R, Maroja LS, Fernandes FA, Coura R, Cerqueira R, 2007. Small mammal populations of an agroecosystem in the Atlantic Forest domain, southeastern Brazil. *Braz J Biol* 67(1): 179–186.
43. Gentile R, D'Andrea PS, Cerqueira R, Maroja LS, 2000. Population dynamics and reproduction of marsupials and rodents in a Brazilian rural area: a five-year study. *Stud Neotrop Fauna Environ* 9: 1–9.

44. Feliciano BR, Fernandez FAS, Freitas D, Figueiredo MSL, 2002. Population dynamics of small rodents in a grassland between fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Mamm Biol* 67(5): 304–314.
45. Cademartori CV, Fabián ME, Menegheti JO, 2004. Variações na abundância de roedores (Rodentia, Sigmodontinae) em duas áreas de Floresta Ombrófila Mista, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Zool* 6(2): 147–167.
46. Cademartori CV, Fabián ME, Menegheti JO, 2005. Biologia reprodutiva de *Delomys dorsalis* (Hensel, 1872) - Rodentia, Sigmodontinae - em área de floresta ombrófila mista, Rio Grande do Sul, Brasil. *Mastozool Neotrop* 12(2): 133–144.
47. Bonecker ST, Portugal LG, Costa-Neto SF, Gentile R, 2009. A long term study of small mammal populations in a Brazilian agricultural landscape. *Mamm Biol* 74(6): 467–477.
48. Antunes PC, Campos MAA, Oliveira-Santos LGR, Graipel ME, 2010. Population dynamics of *Akodon montensis* (Rodentia, Cricetidae) in the Atlantic forest of Southern Brazil, 2010. *Mamm Biol* 75(2): 186–190.
49. Galiano D, Kubiak BB, Marinho JR, Freitas TRO, 2013. Population dynamics of *Akodon montensis* and *Oligoryzomys nigripes* in an Araucaria forest of Southern Brazil. *Mammalia* 77(2): 173–179.
50. Bonvicino CR, Oliveira JA, D'Andrea PS, 2008. *Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos*. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 120p.
51. Oliveira JA, Bonvicino CR, 2011. Ordem Rodentia. Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP, eds. *Mamíferos do Brasil*. Second edition. Londrina, PR: Universidade Estadual de Londrina, 358–414.
52. Boone JD, Otteson EW, McGwire KC, Villard P, Rowe JE, St Jeor SC, 1998. Ecology and demographics of hantavirus infections in rodent populations in the Walker River Basin of Nevada and California. *Am J Trop Med Hyg* 59(3): 445–451.
53. Mills JN, Ksiazek TG, Peters CJ, Childs JE, 1999. Long-term studies of hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: a synthesis. *Emerg Infect Dis* 5(1): 135–142.
54. Mills JN, Schmidt K, Ellis BA, Calderón G, Enría DA, Ksiazek TG, 2007. A longitudinal study of hantavirus infection in three sympatric reservoir species in agroecosystems on the Argentine Pampa. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7(2): 229–240.
55. Suárez OV, Cueto GR, Cavia R, Villafañe IEG, Bilenca DN, Edelstein A, Martínez P, Miguel S, Bellomo C, Hodara K, Padula PJ, Busch M, 2003. Prevalence of infection with

- hantavirus in rodent populations of central Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(6): 727–732.
56. Yahnke CJ, Meserve PL, Ksiazek TG, Mills JN, 2001. Patterns of infection with Laguna Negra virus in wild populations of *Calomys laucha* in the central Paraguayan chaco. *Am J Trop Med Hyg* 65(6): 768–776.
57. Owen RD, Goodin DG, Koch DE, Chu Y-K, Jonsson CB, 2010. Spatiotemporal variation in *Akodon montensis* (Cricetidae: Sigmodontinae) and hantaviral seroprevalence in a subtropical forest ecosystem. *J Mammal* 91(2): 467–481.
58. Piudo L, Monteverde MJ, Walker RS, Douglass RJ, 2011. Rodent community structure and andes virus infection in sylvan and peridomestic habitats in northwestern patagonia, Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11(3): 315–324.
59. Vadell M V, Bellomo C, San Martín A, Padula P, Villafañe IG, 2011. Hantavirus ecology in rodent populations in three protected areas of Argentina. *Trop Med Int Health* 16(10): 1342–1352.
60. Palma RE, Polop JJ, Owen RD, Mills JN, 2012. Ecology of rodent-associated hantaviruses in the Southern Cone of South America: Argentina, Chile, Paraguay, and Uruguay. *J Wildl Dis* 48(2): 267–281.
61. Balbinot R, Valério ÁF, Sanquetta CR, Caldeira MVW, Silvestre R, 2008. Estoque de carbono em plantações de *Pinus* spp. em diferentes idades no Sul do Estado do Paraná. *Floresta* 38(2): 317–324.
62. Mills JN, Childs JE, Ksiazek TG, Peters CJ, 1995. *Methods for Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing*. Atlanta, GA: Center for Disease Control and Prevention, 71p.
63. Bonvicino C, Oliveira JA, Gentile R, 2010. A new species of *Calomys* (Rodentia: Sigmodontinae) from Eastern Brazil. *Zootaxa* 2336: 19–25.
64. Bonvicino CR, 2011. Diversidade cariotípica em roedores Akodontini do Brasil. *Bol Soc Bras Mastozoologia* 62: 7–11.
65. Figueiredo LTM, Moreli ML, Borges AA, Figueiredo GG, Badra SJ, Bisordi I, Suzuki A, Capria S, Padula P, 2009. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on Araraquara Virus recombinant nucleocapsid protein. *Am J Trop Med Hyg* 81(2): 273–276.
66. Mazzarotto GACA, Raboni SM, Stella V, Carstensen S, Noronha L, Levis S, Zanluca C, Zanetti CR, Bordignon J, Santos CND, 2009. Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of Araucaria hantavirus. *J Virol Methods* 162(1-2): 96–100.

67. Guterres A, Oliveira RC, Fernandes J, D'Andrea PS, Bonvicino CR, Bragagnolo C, Guimarães GD, Almada GL, Machado RR, Lavocat M, Elkhoury MDR, Schrago CG, Lemos ERS, 2013. Phylogenetic analysis of the S segment from Juquitiba hantavirus: Identification of two distinct lineages in *Oligoryzomys nigripes*. *Infect Genet Evol* 18: 262–268.
68. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3): 403–410.
69. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28(10): 2731–2739.
70. Glass GE, Childs JE, Korch GW, Leduc JW, 1988. Association of intraspecific wounding with hantaviral infection in wild rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol Infect* 101: 459–472.
71. Paise G, Vieira EM, 2005. Produção de frutos e distribuição espacial de angiospermas com frutos zoocóricos em uma Floresta Ombrófila Mista no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Bot* 28(3): 615–625.
72. Iob G, Vieira EM, 2008. Seed predation of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) in the Brazilian Araucaria Forest: influence of deposition site and comparative role of small and “large” mammals. *Plant Ecol* 198(2): 185–196.
73. Vieira EM, Ribeiro JF, Iob G, 2011. Seed predation of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) by small rodents in two areas with contrasting seed densities in the Brazilian Araucaria Forest. *J Nat Hist* 45(13-14): 843–854.
74. Fonseca GAB, Kierulff MCM, 1989. Biology and natural history of Brazilian Atlantic forest small mammals. *Bull Flor State Mus Biol Sci* 34: 99–152.
75. Graipel ME, Cherem JJ, Monteiro-Filho ELA, Glock L, 2006. Dinâmica populacional de marsupiais e roedores no Parque Municipal da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. *Mastozoología Neotrop* 13(1): 31–49.
76. Hardestam J, Karlsson M, Falk KI, Olsson G, Klingström J, Lundkvist A, 2008. Puumala hantavirus excretion kinetics in bank voles (*Myodes glareolus*). *Emerg Infect Dis* 14(8): 1209–1215.
77. Calisher CH, Sweeney W, Mills JN, Beaty BJ, 1999. Natural history of Sin Nombre virus in western Colorado. *Emerg Infect Dis* 5(1): 126–134.
78. Hinson ER, Shone SM, Zink MC, Glass GE, Klein SL, 2004. Wounding: the primary mode of Seoul Virus transmission among male Norway Rats. *Am J Trop Med Hyg* 70(3): 310–317.

79. Escutenaire S, Chalon P, Jaegere F De, Karelle-bui L, Mees G, Brochier B, Rozenfeld F, Pastoret P, 2002. Behavioral, physiologic, and habitat influences on the dynamics of Puumala Virus infection in Bank Voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerg Infect Dis* 8(9): 930–936.
80. Vieira EM, Paise G, Machado PHD, 2006. Feeding of small rodents on seeds and fruits: a comparative analysis of three species of rodents of the Araucaria Forest, Southern Brazil. *Acta Theriol* 51(3): 311–318.
81. Bohlman MC, Morzunov SP, Meissner J, Taylor MB, Ishibashi K, Rowe J, Levis S, Enria D, Jeor SCS, 2002. Analysis of Hantavirus Genetic Diversity in Argentina: S Segment-Derived Phylogeny. *J Virol* 76(8): 3765–3773.
82. Salazar-Bravo J, Armién B, Suzán G, Armién A, Ruedas LA, Avila M, Zaldívar Y, Pascale JM, Gracia F, Yates TL, 2004. Serosurvey of wild rodents for hantaviruses in Panama, 2000-2002. *J Wildl Dis* 40(1): 103–109.
83. Raboni SM, Rubio G, Borba L de, Zeferino A, Skraba I, Goldenberg S, Duarte dos Santos, 2005. Clinical survey of hantavirus in southern Brazil and the development of specific molecular diagnosis tools. *Am J Trop Med Hyg* 72(6): 800–804.
84. Monroe MC, Morzunov SP, Johnson AM, Bowen MD, Artsob H, Yates T, Peters CJ, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST, 1999. Genetic diversity and distribution of Peromyscus-borne hantaviruses in North America. *Emerg Infect Dis* 5(1): 75–86.
85. Santos ED, Coelho GE, Silva LR, Camargo NJ, Rúbio GGG, Correa DS, Stremel N, Elkhoury MR, Oliveira RC, Martins EC, Ferreira IB, Pereira LE, Hatch DL, 2002. *Fatores de risco para infecção por hantavirus entre trabalhadores florestais no Paraná, agosto a novembro de 2000*. Boletim eletrônico epidemiológico - Ministério da Saúde, Brasil Ano 02(1): 8–9. Available at: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano02\\_n01\\_fatores\\_risco\\_hantavirus\\_pr.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano02_n01_fatores_risco_hantavirus_pr.pdf).



Table 1. Species prevalence, sex and hantavirus genotype of infected specimens (seropositives and PCR confirmed). M = males, F =females. Jaborá Virus (JABV), Juquitiba-like Virus (JUQV-like)

<b>Species</b>	<b>Number of infected rodents / total of captured rodents</b>	<b>Gender</b>	<b>Hantavirus genotype</b>
<i>Akodon montensis</i>	16/253 (5.91%)	16M	JABV
<i>Akodon paranaensis</i>	5/87 (5.68%)	2M/2F 1F	JABV JUQV-like
<i>Akodon serrensis</i>	2/401 (0.74%)	1M/1F	JABV
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	3/73 (4.17%)	3M	JUQV-like
<b>TOTAL</b>	<b>26/814 (3.19%)</b>	<b>22M</b> <b>4F</b>	<b>JABV</b> <b>JUQV-like</b>

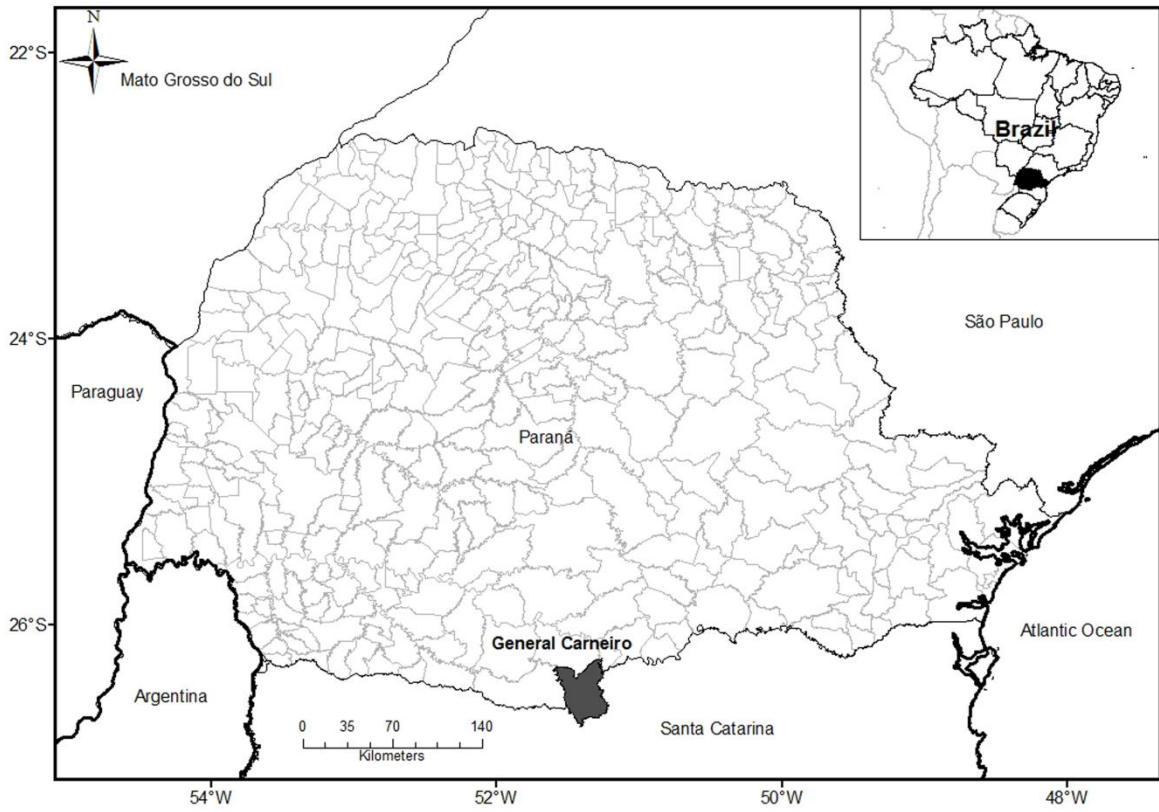


Figure 1. General Carneiro municipality, State of Paraná, southern Brazil

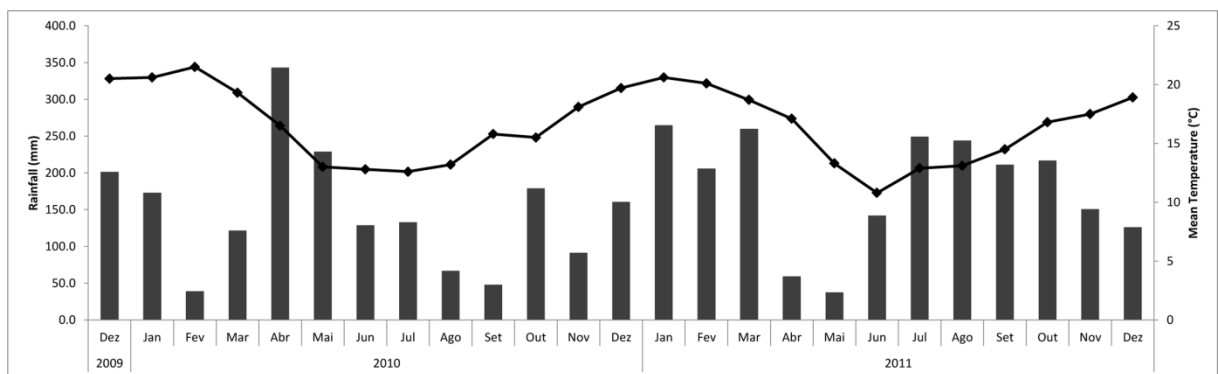


Figure 2. Climatic diagram of the study area obtained from December 2009 to December 2011. Rainfall (mm) = gray bars; Average Temperature (°C) = Dark line

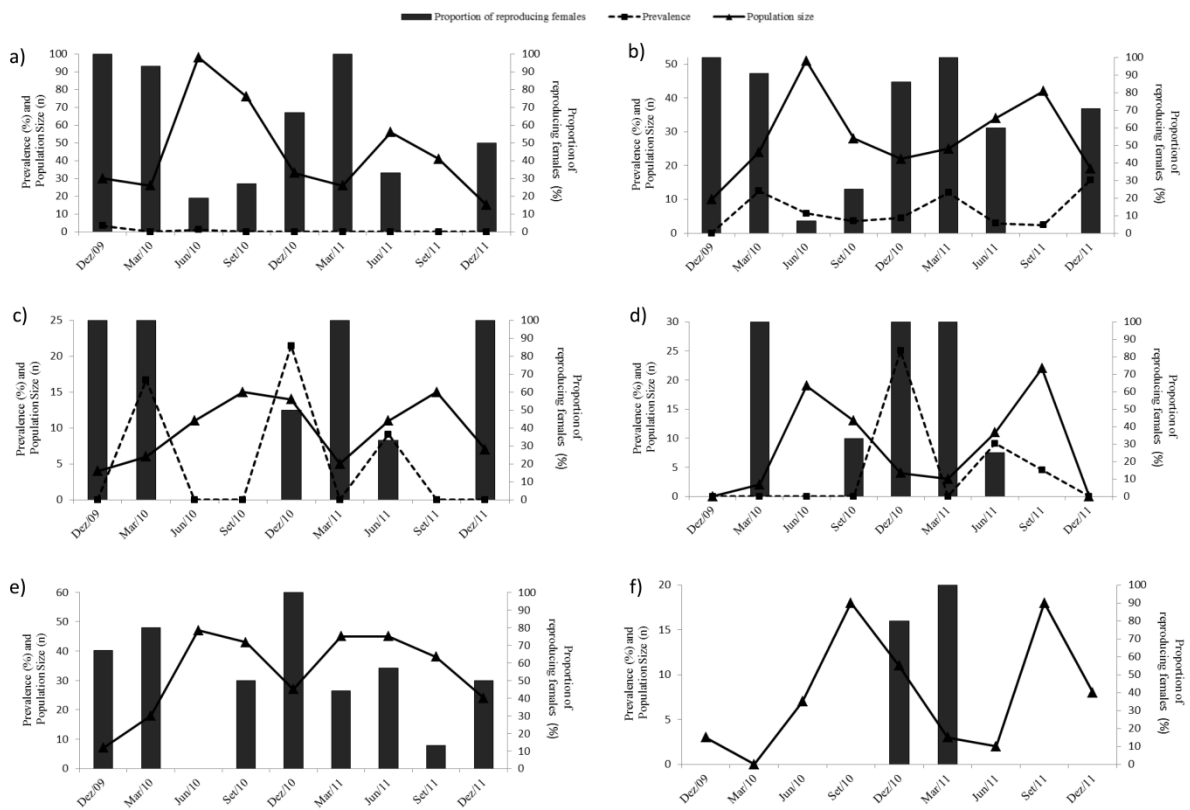


Figure 3. Population sizes, proportion of reproducing females and prevalences of hantavirus infection for: a) *Akodon serrensis*, b) *Akodon montensis*, c) *Akodon paranaensis*, d) *Oligoryzomys nigripes*, e) *Oxymycterus judex* and f) *Thaptomys nigrita*, in General Carneiro, between December 2009 and December 2011. (Grey bars = Proportion of reproducing females; Dotted line = Hantavirus prevalence; Continuous line = Population size)

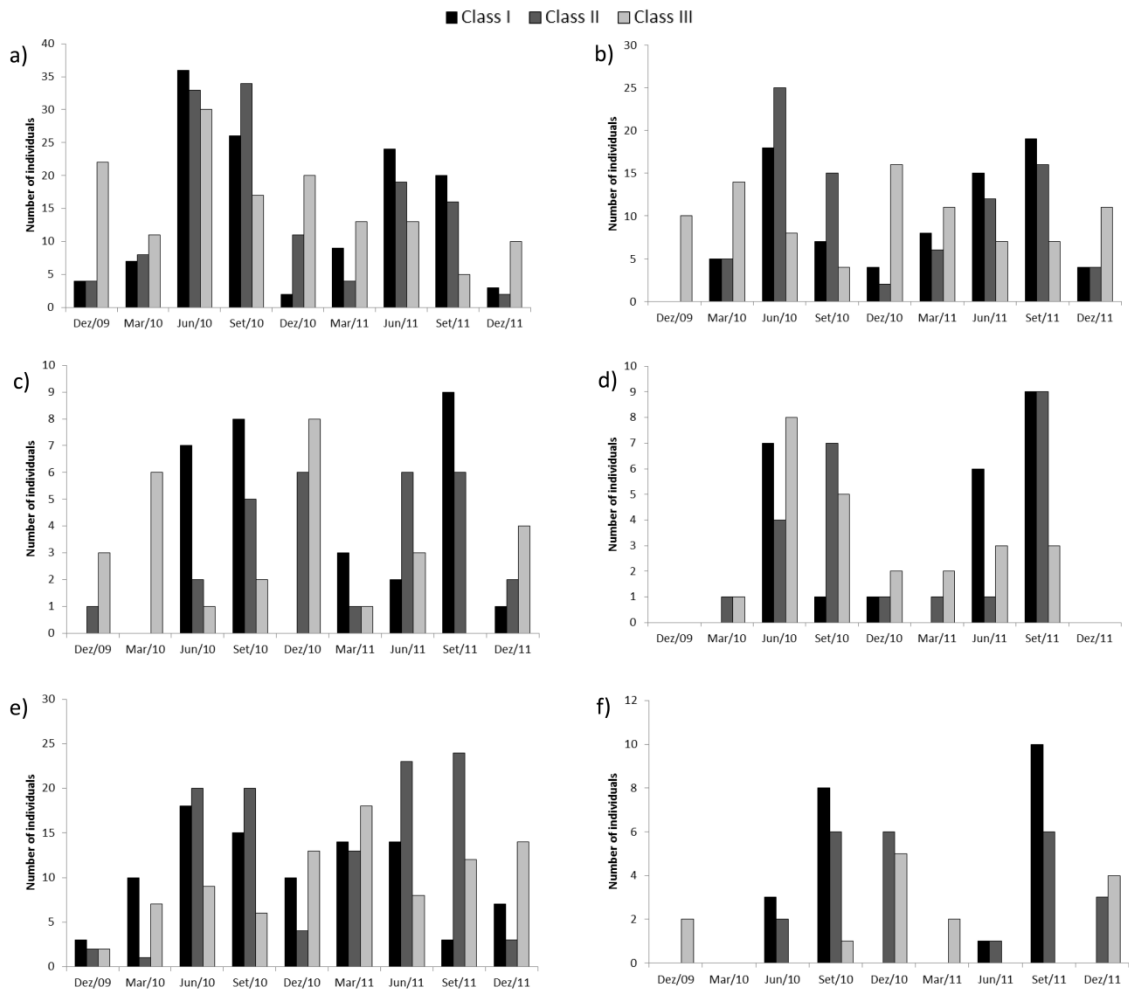


Figure 4. Age structure of a) *Akodon serrensis*, b) *Akodon montensis*, c) *Akodon paranaensis*, d) *Oligoryzomys nigripes*, e) *Oxymycterus judex* and f) *Thaptomys nigrita*, in General Carneiro, between December 2009 and December 2011 (Black bar = Class I; Dark Grey bar = Class II; Light Grey bar = Class III)

## ANEXO

As relações filogenéticas entre os genótipos virais citados no Capítulo 2 estão apresentadas nas Figuras 5, 6 e 7, em anexo. As sequências de JABV e JUQV encontradas nos roedores de General Carneiro estão relacionadas à outras sequências depositadas no GenBank, confirmando a identificação destes genótipos virais. Além disso nenhuma estruturação foi observada em relação às seis áreas de estudo (ver Capítulo 3 para maiores detalhes sobre as áreas), tanto nas infecções de hospedeiros primários quanto nas infecções *spillover*.

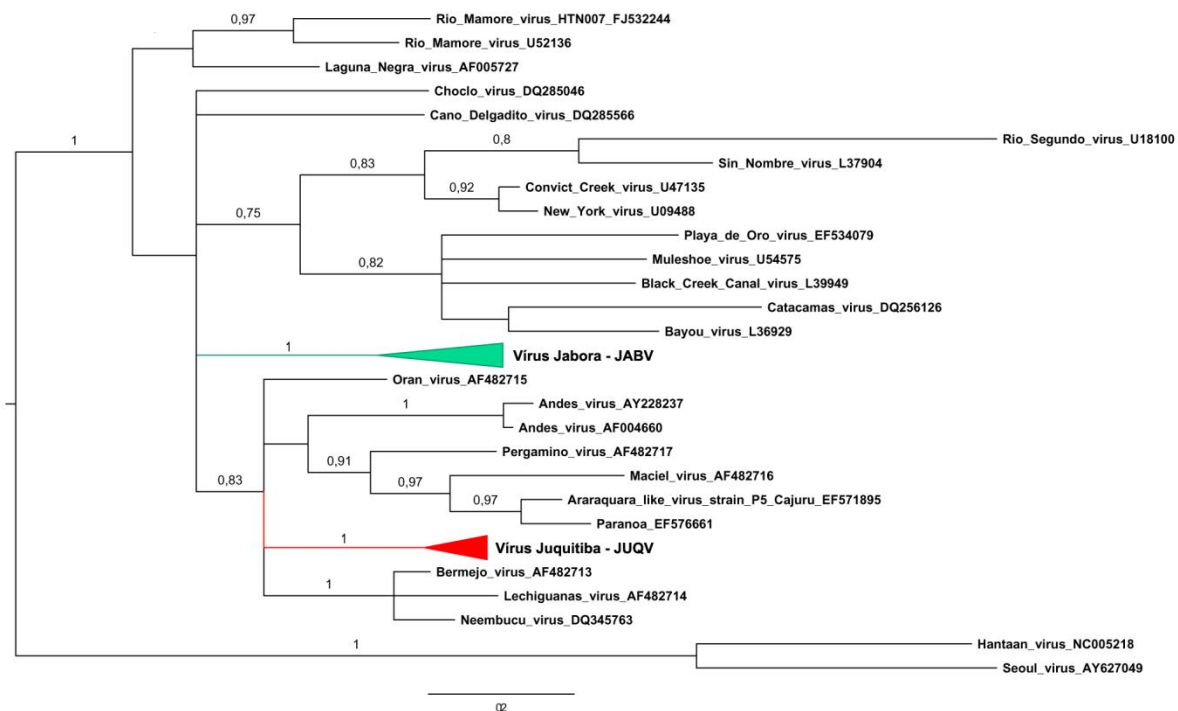


Figura 5. Relações filogenéticas dos hantavírus, inferidas por análise Bayesiana, implementado na ferramenta Mr. Bayes 3.1.2, comparando 380 nucleotídeos do segmento S da região codificante do nucleocapsídeo. A barra de escala indica uma distância evolutiva de 0,2 substituições por posição na sequência. Os valores numéricos nos ramos representam a probabilidade posterior de suporte dos ramos internos ( $\geq 0,7$ ). As legendas, após o nome do genótipo viral, em cada ramo, incluem o número de acesso da sequência no GenBank. Os clados dos genótipos JABV (em verde) e JUQV (em vermelho) foram condensados, sendo apresentados expandidos nas figuras 6 e 7.

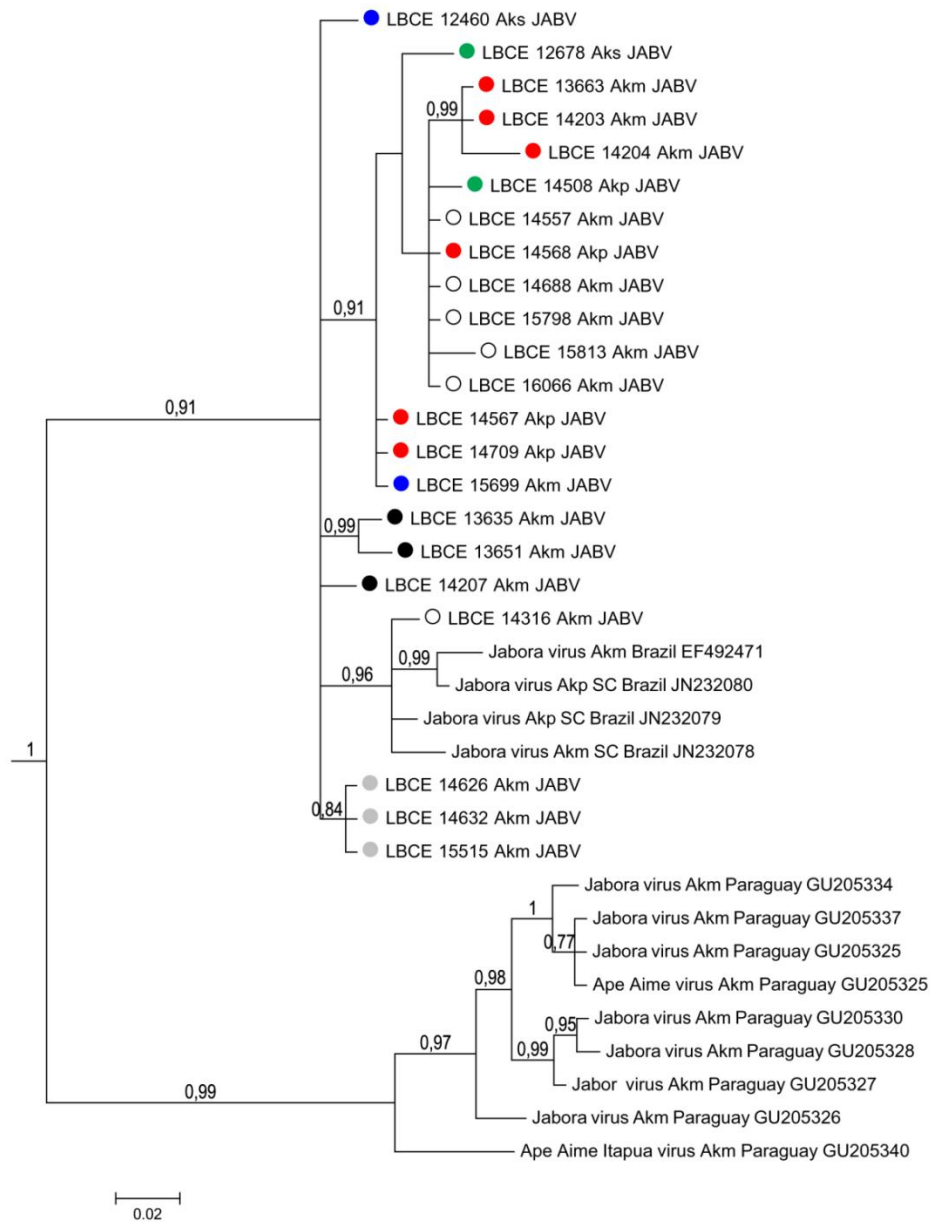


Figura 6. Expansão do clado Jaborá (JABV), encontrado em verde na Figura 5. A barra de escala indica uma distância evolutiva de 0,02 substituições por posição na sequência. Os valores numéricos nos ramos representam a probabilidade posterior de suporte dos ramos internos ( $\geq 0,7$ ). As legendas, após o nome do genótipo viral, em cada ramo, incluem o número de acesso da sequência no GenBank. As amostras sequenciadas neste estudo estão representadas por: localidade de captura do roedor hospedeiro (Círculo Verde = Araucárias; Círculo Cinza = Bomba; Círculo Branco = RPPN; Círculo Preto = Escadaria; Círculo Azul = São Zacharias; Círculo Vermelho = Alagado); número de depósito do roedor na coleção zoológica temporária do LABPMR, IOC/FIOCRUZ; espécie do roedor (Akm = *Akodon montensis*; Aks = *Akodon serrensis*; Akp = *Akodon paranaensis*) e genótipo viral associado.

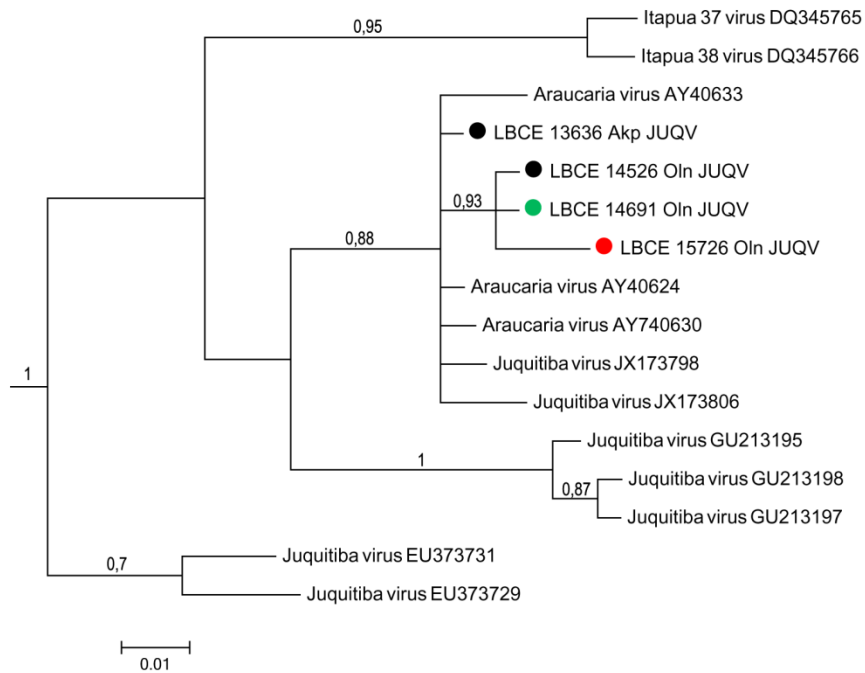


Figura 7. Expansão do clado Juquitiba (JUQV), encontrado em vermelho na Figura 5. A barra de escala indica uma distância evolutiva de 0,01 substituições por posição na sequência. Os valores numéricos nos ramos representam a probabilidade posterior de suporte dos ramos internos ( $\geq 0,7$ ). As legendas, após o nome do genótipo viral, em cada ramo, incluem o número de acesso da sequência no GenBank. As amostras sequenciadas neste estudo estão representadas por: localidade de captura do roedor hospedeiro (Círculo Verde = Araucárias; Círculo Preto = Escadaria; Círculo Vermelho = Alagado); número de depósito do roedor na coleção zoológica temporária do LABPMR, IOC/FIOCRUZ; espécie do roedor (Akp = *Akodon paranaensis*; Oln = *Oligoryzomys nigripes*) e genótipo viral associado.



## **CAPÍTULO 3**

### **Ecologia de comunidades de roedores hospedeiros de hantavírus, no município de General Carneiro, sul do Estado do Paraná**

Este capítulo apresenta análises complementares às apresentadas no capítulo 2. São apresentadas as comparações entre as 6 áreas estudadas no município de General Carneiro. As áreas de estudo foram classificadas de acordo com a paisagem e comparadas em relação à composição, riqueza e abundância das espécies de roedores e sua associação com a prevalência de infecção por hantavírus. A preferência por micro-habitat e a co-ocorrência das espécies foi determinada e discutida em relação aos dados de infecção, além de ser determinado um modelo descritivo de ocorrência de hantavírus nas espécies de roedores hospedeiros.

## CAPÍTULO 3

### **Ecologia de comunidades de roedores hospedeiros de hantavírus, no município de General Carneiro, sul do Estado do Paraná**

#### **OBJETIVOS**

- 1) Analisar comparativamente a composição, riqueza e abundância relativa das espécies de roedores nas áreas de estudo e sua associação com a infecção por hantavírus.
- 2) Identificar as variáveis do micro-habitat determinantes da ocorrência das espécies de pequenos mamíferos.
- 3) Definir um modelo descritivo de ocorrência de cada genótipo viral considerando dados populacionais e de comunidades dos roedores.

#### **HIPÓTESES**

- 1) Premissa: A composição, riqueza e abundância relativa das espécies de roedores silvestres variam conforme a área estudada. Hipótese: Áreas mais preservadas possuem maior riqueza, além de possuir uma menor abundância relativa de espécies generalistas.
- 2) Premissa: A infecção por hantavírus entre os roedores silvestres variam conforme a riqueza e a abundância relativa. Hipótese: Maiores prevalências de infecção nas espécies hospedeiras ocorrem em áreas com menor riqueza de espécies e com maior abundância de machos adultos de *Akodon montensis* e *Oligoryzomys nigripes*.

#### **MATERIAL E MÉTODOS**

##### *Área de estudo*

No município de General Carneiro foram escolhidas seis áreas com diferentes estados de conservação para realização do estudo (Figura 3.1), sendo três áreas na Sede da Madeireira Pizzatto (áreas Bomba, RPPN e Escadaria) (Figura 3.2), duas em Lageado Grande, também pertencente às Indústrias Pizzatto (áreas Araucárias e Alagado) (Figura 3.3) e uma na Madeireira São Zacharias (São Zacharias) (Figura 3.4).

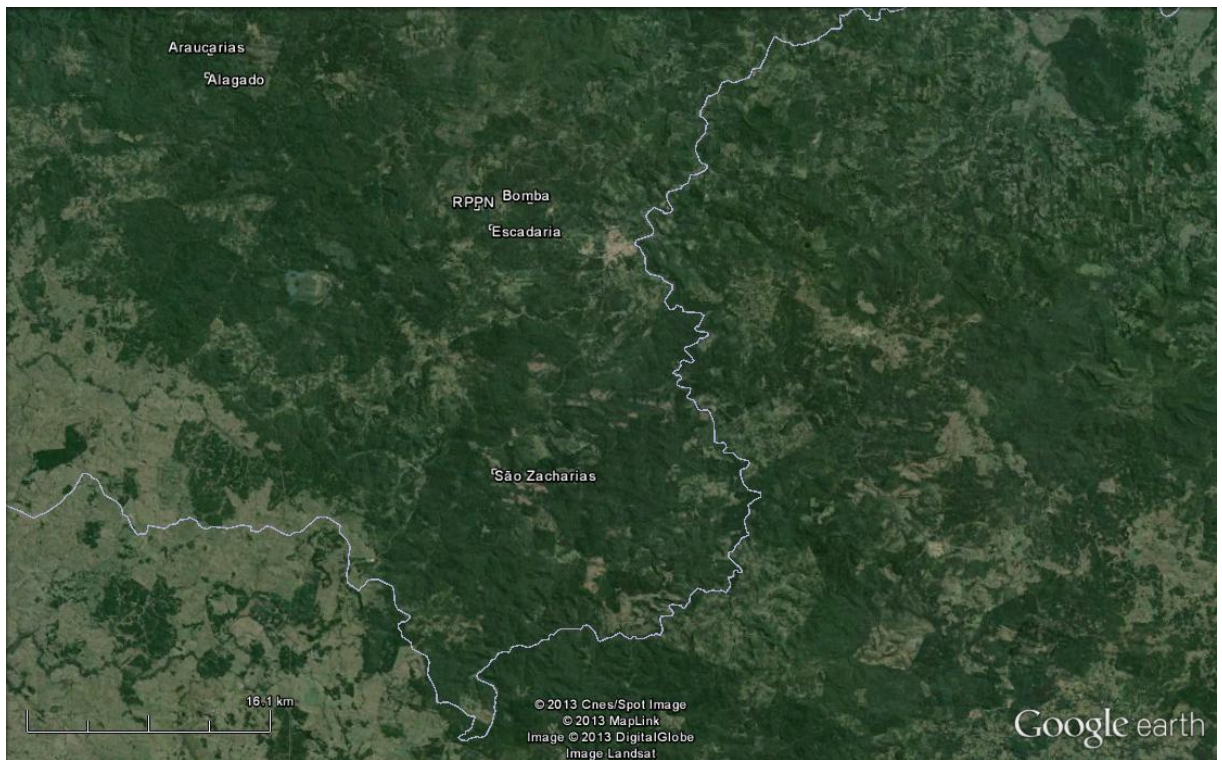


Figura 3.1. Áreas estudadas no período 2009-2011, no município de General Carneiro/PR: Araucárias, Alagado, Bomba, RPPN, Escadaria e São Zacharias. Imagem modificada do Google Earth®.

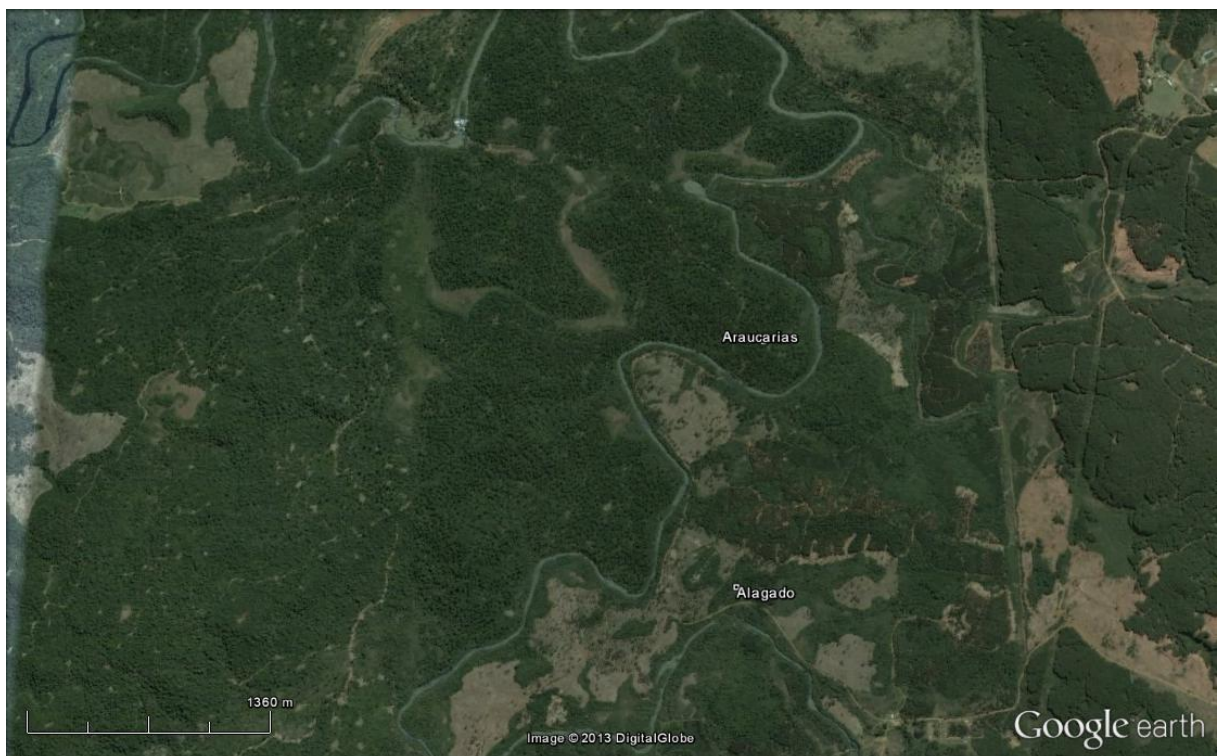


Figura 3.2. Detalhe das áreas Araucárias e Alagado, no município de General Carneiro/PR. Imagem modificada do Google Earth®.

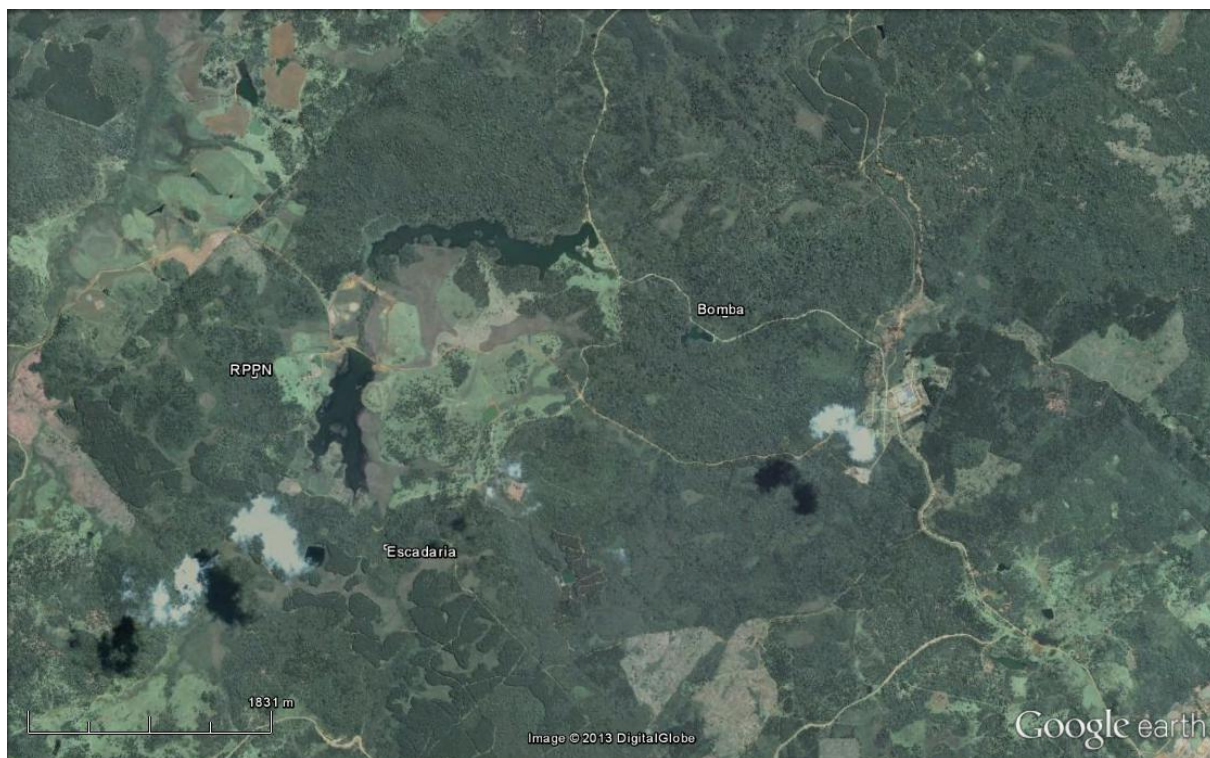


Figura 3.3. Detalhe das áreas Bomba, RPPN e Escadaria, no município de General Carneiro/PR. Imagem modificada do Google Earth®.

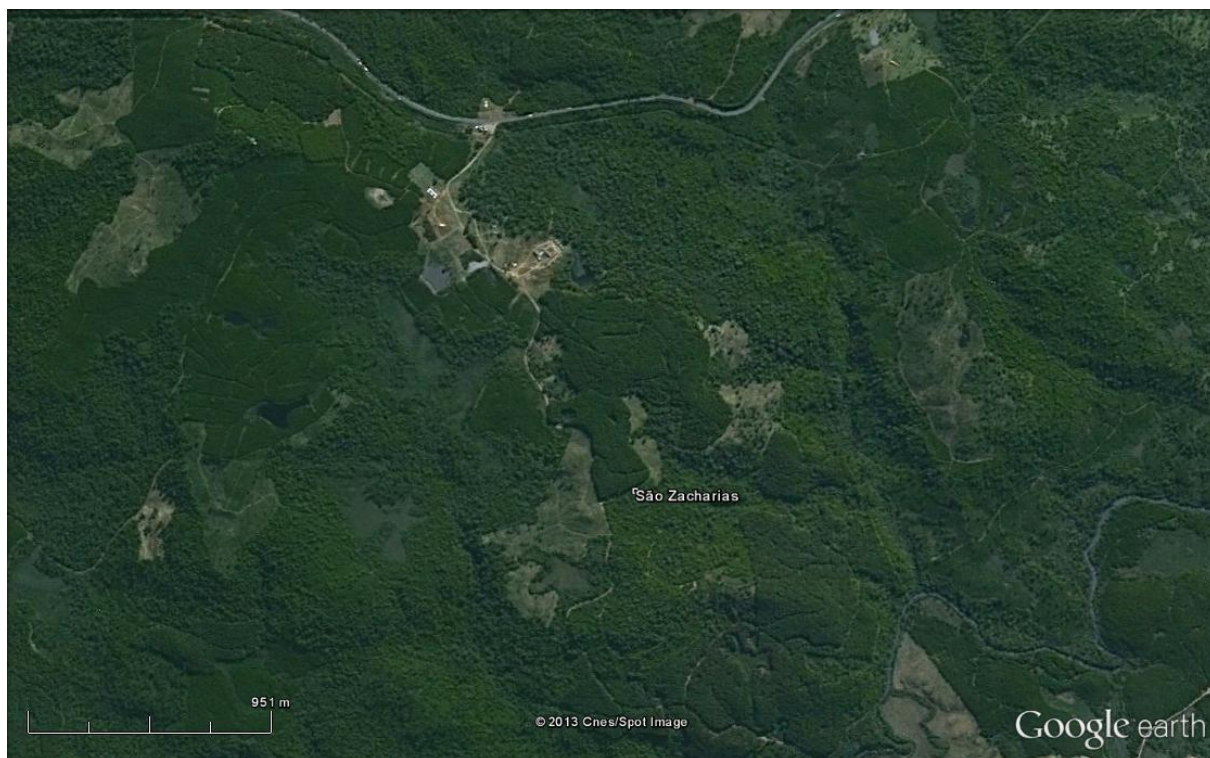


Figura 3.4. Detalhe da área São Zacharias, no município de General Carneiro/PR. Imagem modificada do Google Earth®.

As áreas de estudo foram classificadas de acordo com suas características da paisagem, com base em análise de imagens de satélite. Inicialmente foram obtidas as coordenadas de todas as estações de captura ao longo de cada transecto. Estas informações foram plotadas no software ArcMap<sup>TM</sup> 9.3 juntamente com as imagens de satélite da área de estudo, cedidas pela Madeireira Pizzato, ou plotadas no software Google Earth<sup>®</sup> no caso da Fazenda São Zacharias. Foi então estabelecido um buffer de 100m em volta de cada transecto, formando posteriormente um único buffer com as características de cada área de estudo. De acordo com as análises *in loco* e com informações já contidas nas imagens cedidas, foram definidas as variáveis da paisagem em cada buffer:

- Mata nativa: Áreas nativas de mata de Araucárias;
- Brejo: Áreas alagadas;
- Campo antrópico: Áreas degradadas de vegetação nativa, para uso como áreas de plantio de *Pinus elliotti* e *Pinus taeda*;
- Pinus: Áreas de reflorestamento de *Pinus elliotti* e *Pinus taeda*;
- Estrada: Estradas de terra vicinais;
- Água: Rios, córregos ou lagos artificiais.

Foram estimadas as áreas (m<sup>2</sup>) relativas a cada variável da paisagem em cada buffer, sendo então calculados os percentuais de cobertura de cada variável nas seis áreas de estudo. Foi então realizada uma análise de NMDS (Escalonamento multi-dimensional) baseada em uma matriz de distância euclidiana, no programa SYSTAT<sup>®</sup>, com o objetivo de analisar a similaridade entre as seis áreas a partir destas características.

As características gerais das áreas de estudo estão descritas na tabela 3.1 e indicam o tamanho das árvores predominantes (pequeno, médio e grande porte), o tipo de sub-bosque (aberto, semi-aberto e fechado), o tipo de curso d'água (Rio, Córrego, Lago artificial ou Brejo), o local de ocorrência do curso d'água (no transecto ou próximo ao transecto), a quantidade de Araucárias, Taquaras e Pinus (Pouco, Regular, Muito) e o tipo de presença humana observada (Colheita de Erva-Mate e Colheita de Pinus).

Tabela 3.1. Características gerais das seis áreas de estudo em General Carneiro/PR.

<b>Área de Estudo</b>	<b>Árvores predominantes</b>	<b>Sub-Bosque</b>	<b>Tipo de Curso dagua</b>	<b>Localização do Curso dagua</b>	<b>Araucárias</b>	<b>Taquaras</b>	<b>Pinus</b>	<b>Presença Humana</b>
<b>Araucárias</b>	grande porte	Aberto/Semi-aberto	Rio	Próximo ao transecto	Muito	Regular	Ausente	Colheita
<b>Bomba</b>	médio /grande porte	Semi-aberto	Córrego	No transecto	Regular	Muito	Ausente	Erva-Mate
<b>RPPN</b>	grande porte	Fechado	Ausente	Ausente	Muito	Regular	Ausente	Ausente
<b>Escadaria</b>	médio /grande porte	Aberto/Semi-aberto	Córrego/Lago	No transecto	Regular	Muito	Pouco	Ausente
<b>São</b>								Colheita
<b>Zacharias</b>	médio /grande porte	Aberto	Ausente	Ausente	Pouco	Regular	Muito	Pinus
<b>Alagado</b>	grande porte	Semi-aberto/Fechado	Brejo	No transecto	Regular	Muito	Pouco	Ausente

Área Araucárias: Localizada na Fazenda Lageado Grande. Área de Reserva Legal de aproximadamente 690 ha, com vegetação nativa, próxima ao Rio Lageado Grande. Possui relevo inclinado e uma espécie de taquara (*Merostachys claussonii*). Grande quantidade de Araucárias, além de outras espécies como Asteraceae (Vassourão e Cambará), Moraceae (Mamica de cadela), Mimosaceae (Bracatinga), Myrtaceae (Guamirim-branco), Arecaceae (Butiá), Aquifoliaceae (Erva-Mate) e Euphorbiaceae (Branquilha) (Figura 3.5A). Coordenadas: 26°18'21.24"S; 51°35'1.50"O.

Área Bomba: Localizada na Sede da Madeireira Pizzatto. Apesar de ter seu início localizado em trilha arbustiva (Asteraceae) já aberta, possui extensa área de mata nativa, com árvores de médio e grande porte e uma área total de aproximadamente 600 ha. Possui grande quantidade de touceiras de taquaras em sua extensão (aproximadamente 3 espécies), presença de um córrego próximo a alguns pontos de captura com troncos e pedras em sua margem, Araucárias e espécies de Lauraceae (Canela), Myrtaceae (Cerejeira, Guamirim-branco, Uvaia, Guabiroba) e Anacardiaceae (Aroeira-vermelha, Bugreiro) (Figura 3.5B). Coordenadas: 26°23'40.70"S; 51°22'12.10"O.

Área RPPN: Localizada na Sede da Madeireira Pizzatto. Área de Reserva Particular do Patrimônio Nacional (RPPN) de aproximadamente 120 ha de mata nativa com sub-bosque fechado. Foi observada uma grande presença de Araucárias, Asteraceae (Vassourinha, Vassourão), Mimosaceae (Bracatinga), Lauraceae (Canela), Moraceae (Mamica de cadela), Melastomataceae (Miconia), Solanaceae (Arrebenta-cavalo), Winteraceae (Casca de Anta), Myrtaceae (Guamirim-branco) e Bignoniaceae (Figura 3.5C). Coordenadas: 26°23'55.70"S; 51°24'20.00"O.

Área Escadaria: Localizada na Sede da Madeireira Pizzatto. Área de mata nativa com um transecto beirando um córrego e terminando em uma pequena cachoeira, e outro margeando um lago artificial, apresentando folhiço, troncos e rochas em suas margens. Grande quantidade de taquaras (*Guadua chacoensis* e *Merostachys claussonii*), além da presença de Araucárias, Dicksoniaceae (Xaxim), Myrtaceae (Guamirim-branco), Aquifoliaceae (Erva-Mate), Winteraceae (Casca de Anta), Euphorbiaceae (Branquilha) e alguns raros exemplares de Pinus. Em todas as árvores observam-se fungos liquenizados (Figura 3.5D). Coordenadas: 26°24'37.60"S; 51°23'44.50"O.

Área São Zacharias: Localizada na Madeireira São Zacharias. Área modificada por silvicultura, com plantio de Pinus em diversos estágios de crescimento. As armadilhas foram dispostas tanto no interior das áreas de Pinus quanto em borda de plantação de Pinus com remanescentes degradados e abertos de mata nativa. Presença de duas espécies de taquaras, Asteraceae (Vassourinha, Vassourão), Aquifoliaceae (Erva-Mate), Solanaceae (Jurubeba) e Cyperaceae (Capim-Navalha). Em algumas áreas remanescentes de mata nativa é possível observar a presença de Araucárias esparsas. No interior da mata de Pinus a vegetação é rasteira e aberta (Figura 3.5E). Coordenadas: 26°33'21.70"S; 51°23'38.00"O.

Área Alagado: Localizada na Fazenda Lageado Grande. Representa um mosaico de remanescentes de vegetação nativa, campo degradado, área de brejo e borda de área de silvicultura, próximas ao Rio Lageado Grande. Grande quantidade de touceiras de taquara (*Guadua chacoensis*), além de exemplares de Mimosaceae (Bracatinga), Flacourtiaceae (Guaçatunga), Asteraceae (Vassourão), Myrtaceae (Guamirim-branco), Arecaceae (Butiá) e Bignoniaceae (Figura 3.5F). Coordenadas: 26°19'9.90"S; 51°35'8.50"O.



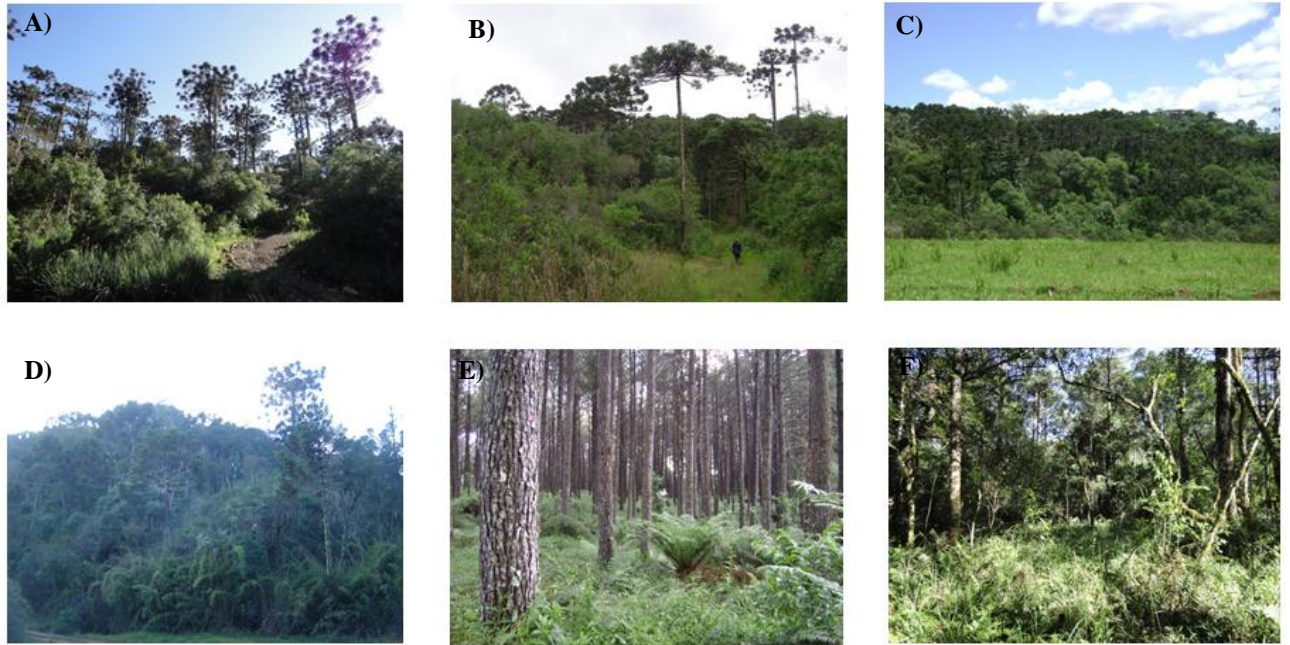


Figura 3.5. Áreas amostradas no estudo realizado entre 2009 e 2011 no município de General Carneiro/PR: A) Araucárias; B) Bomba; C) RPPN; D) Escadaria; E) São Zacharias; F) Alagado

#### *Desenho Amostral e Esforço de Captura*

Foram estabelecidos um total de 12 transectos nas seis áreas de estudo (2 transectos por área). Cada transecto possuía 20 estações de captura espaçadas em cerca de 15 metros. Os transectos foram estabelecidos por 5 noites consecutivas em cada expedição de coleta. O esforço de captura total foi de 1500 armadilhas-noite em cada expedição e foi estimado através do número de armadilhas estabelecidas, multiplicado pelo número de noites de captura.

### *Estudo do Micro-habitat*

Para a caracterização do micro-habitat das espécies de pequenos mamíferos, foram consideradas diversas variáveis quantitativas do habitat, tomadas na expedição de setembro de 2010 e associadas aos dados de captura de pequenos mamíferos desta mesma expedição.

Foram medidas variáveis quantitativas tomadas em cinco pontos de cada estação de captura da seguinte forma: central, norte, sul, leste e oeste. Os pontos adjacentes foram posicionados a cerca de 1,5m do ponto central de acordo com Freitas et al. (2002) modificado, formando uma área de 9 m<sup>2</sup> ao redor das armadilhas, sendo este considerado o microhabitat. As variáveis estimadas foram medidas de acordo com Freitas et al. (2002) e englobam: porcentagem de folhiço (FOL), de pedras (PED), de exposição do solo (SOLO), de água (AGUA), de partes de plantas verdes (raízes e plântulas) (CHL) e de cobertura do dossel (COB\_DOSS); número de troncos caídos (TRON); altura do dossel (ALT\_DOSS); densidade de partes herbáceas e lenhosas em três diferentes alturas (OFV1, OFV2, OFV3); número de Araucárias (ARA); número de Pinus (PIN) e número de árvores com diâmetro a altura do peito maior que 5cm (DAP).

FOL – porcentagem de cobertura de folhiço em 1m<sup>2</sup>;

PED - porcentagem de cobertura de pedra em 1m<sup>2</sup>;

SOLO – porcentagem de exposição do solo em 1m<sup>2</sup>;

AGUA – porcentagem de água em 1m<sup>2</sup>;

CHL - porcentagem de partes de plantas verdes em 1m<sup>2</sup>;

COB\_DOSS - porcentagem de cobertura de dossel em 1m<sup>2</sup>;

TRON – número de troncos caídos em uma area de 9m<sup>2</sup> area;

ALT\_DOSS – altura de dossel;

OFV1 – porcentagem de obstrução foliar de 0 a 0,5m de altura em 1m<sup>2</sup>;

OFV2 - porcentagem de obstrução foliar de 0,5 a 1m de altura em 1m<sup>2</sup>;

OFV3 - porcentagem de obstrução foliar de 1 a 1,5m de altura em 1m<sup>2</sup>;

ARA - número de Araucárias em uma area de 9m<sup>2</sup>;

PIN - número de Pinus em uma area de 9m<sup>2</sup>;

DAP - número de árvores com diâmetro a altura do peito maior que 5cm em uma área de 9m<sup>2</sup>

As variáveis FOL, PED, SOLO, AGUA, CHL, COB\_DOSS, OFV1, OFV2 e OFV3, foram medidas com um quadrado de 1m<sup>2</sup>, sendo que o centro da medição era o local das armadilhas. O instrumento de medição constitui-se de um quadrado com bordas de madeira (0,5 x 0,5 m), dividido em 100 quadrados menores confeccionados com arame de modo a formar uma tela. As medições foram realizadas pela quantificação do número de obstrução dos quadrados, sendo considerados visualmente obstruídos aqueles com mais de 50% de obstrução ou vazios com menos de 50% de obstrução visual. O número de troncos caídos, de Araucárias e de Pinus foram determinados por contagem direta e a altura do dossel foi estimada a olho nu. Todas as variáveis, com exceção de ALT\_DOSS, foram transformadas em uma unidade de área padrão de acordo com (Cerqueira & Freitas 1999) de forma a uniformizar sua quantificação.

A preferência de habitat pelas espécies de pequenos mamíferos foi analisada através de regressão logística (*stepwise backwards*) no programa SPSS<sup>®</sup>, considerando-se a presença ou ausência de cada indivíduo e as variáveis de cada ponto de captura. Para estas análises foi feita uma matriz de correlação no programa BioEstat 5.0<sup>®</sup> (Ayres et al. 2007) para se eliminar as variáveis correlacionadas.

Índices de complexidade e de heterogeneidade do habitat foram calculados para cada área de estudo. A complexidade do habitat é a proporção da densidade da vegetação total encontrada em um dado estrato vertical, enquanto que a heterogeneidade indica a variação horizontal nas características do habitat. A complexidade foi calculada de acordo com (August 1983), através de uma Análise de Componentes Principais para as variáveis OFV1, OFV2, OFV3, ALT\_DOSS e DAP, sendo o índice de complexidade considerado como a média dos valores do componente 1. A heterogeneidade foi determinada a partir das variáveis FOL, PED, SOLO, AGUA, CHL, COB\_DOSS, TRON e ARA, baseando-se no método utilizado por (Paglia et al. 1995) que usou a variância das variáveis entre os pontos de armadilhagem como medida para a heterogeneidade do habitat. Uma medida de heterogeneidade foi determinada para cada área de estudo, dividindo-se a variância de cada variável pela variância total de todos os pontos de captura, e por fim somando-se estes quocientes.

## *Análise de parâmetros de comunidades*

A riqueza de espécies dos roedores foi quantificada pelo número total de espécies coletadas em cada área. A abundância foi determinada pelo número de indivíduos coletados de cada espécie uma vez que o esforço de captura foi igual em todas as áreas.

A composição de espécies de roedores em cada área foi analisada através de um NMDS (Escalonamento multidimensional) baseado em uma matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis (Legendre & Legendre 1998), no programa SYSTAT<sup>®</sup>, com o objetivo de analisar o agrupamento entre as seis áreas a partir deste parâmetro. Uma análise de PCA (Análise de Componentes Principais) das variáveis da paisagem foi realizada e os valores dos dois componentes principais (*factor scores*) que mais explicaram a variação nos dados foram relacionados aos dois eixos obtidos no NMDS através de uma regressão linear múltipla, com o objetivo de verificar se há influência destas variáveis na composição de espécies.

A composição de espécies a partir da matriz de Bray-Curtis foi ainda relacionada aos índices de Heterogeneidade e Complexidade a partir de matrizes de dissimilaridade. Para esta análise foi realizado o teste de Mantel (Mantel 1967), utilizando correlação de Pearson e 10000 permutações, no programa XLSTAT<sup>®</sup>. Para construção das matrizes de dissimilaridade das variáveis explicativas foi usado o índice de Gower (Legendre & Legendre 1998). Estas matrizes foram calculadas através da fórmula  $D=1-S$ , sendo S o valor do índice de similaridade e D a medida de dissimilaridade.

A co-ocorrência das espécies foi analisada a partir de uma tabela de abundância de cada espécie para cada ponto de captura. Foi utilizada uma matriz de correlação linear de Spearman com o objetivo de avaliar a co-ocorrência (segregação espacial ou sobreposição) de espécies de acordo com o estudo de Gentile & Fernandez (1999). As análises foram realizadas no programa BioEstat 5.0 (Ayres et al. 2007) e foram calculadas para cada expedição de captura em separado.

### *Análise de parâmetros da infecção por hantavírus*

A prevalência total de infecção por hantavírus foi avaliada dividindo-se o número de roedores infectados pelo número total de roedores analisados para cada área. Foi também calculada a prevalência de infecção de JABV e JUQV em separado. Nestes casos a prevalência foi avaliada dividindo-se o número de roedores infectados pelo número total de indivíduos das espécies infectadas por cada genótipo viral.

Para identificar quais variáveis bióticas e abióticas (variáveis explicativas) estão diretamente relacionadas com a ocorrência de infecção (variável dependente), foram construídos modelos lineares generalizados (GLM) no programa *R*, com distribuição binomial e função de ligação *logit*. O objetivo desta análise é gerar modelos descritivos da infecção por hantavírus e por JABV e JUQV em separado. A análise foi realizada a partir do banco de dados obtido contendo as seguintes variáveis explicativas: i) bióticas – espécie, sexo, classe etária, condição reprodutiva e presença de cicatrizes; e ii) abióticas – estação do ano, área de estudo, precipitação no mês anterior, temperatura no mês anterior, riqueza de espécies, abundância de *A. serrensis* e abundância de *A. montensis*. Para seleção das variáveis nos modelos foi realizada uma análise univariada *a priori* entre a variável dependente e cada variável resposta. As variáveis significativas foram acrescentadas ao modelo e a partir do método *stepwise backwards* foi considerado o modelo mais parcimonioso de acordo com o decréscimo nos valores de AIC. O modelo escolhido foi validado através do teste de Hosmer-Lemeshow que o compara com subgrupos do total de dados. Neste caso, para que o modelo seja validado o *p-valor* do teste deve ser maior que 0,05, já que a hipótese nula é que o modelo escolhido é adequado.

## RESULTADOS

### *Classificação das áreas de estudo*

As seis áreas de estudo foram classificadas de acordo com o grau de similaridade e foram agrupadas em pares (Tabela 3.2; Figura 3.6). As áreas mais preservadas e com maior extensão, Araucárias e Bomba, foram classificadas como mais similares entre si, bem como RPPN e Escadaria, que são as áreas mais próximas entre si. São Zacharias e Alagado foram as mais distintas dentre as seis áreas amostradas. Além destas últimas possuem as menores coberturas de mata nativa, São Zacharias é a única área com uma grande extensão de plantação de Pinus e Alagado representa um mosaico de todas as variáveis da paisagem, com uma grande área de brejo e a maior extensão de áreas abertas (campo antrópico) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Porcentagem de cada variável da paisagem e índices de heterogeneidade e complexidade presentes em cada uma das seis áreas de estudo.

Área	Mata		Campo			
	Nativa	Água	Brejo	Antrópico	Pinus	Estrada
<b>Araucarias</b>	89.78	3.70	0.00	2.72	0.00	3.80
<b>Bomba</b>	83.08	5.17	0.00	0.00	0.00	11.75
<b>RPPN</b>	83.96	0.00	0.00	15.49	0.00	0.55
<b>Escadaria</b>	83.29	1.12	0.00	13.35	0.00	2.24
<b>São Zacharias</b>	51.62	0.00	0.00	11.77	34.86	1.75
<b>Alagado</b>	41.05	1.08	28.12	21.67	6.13	1.96

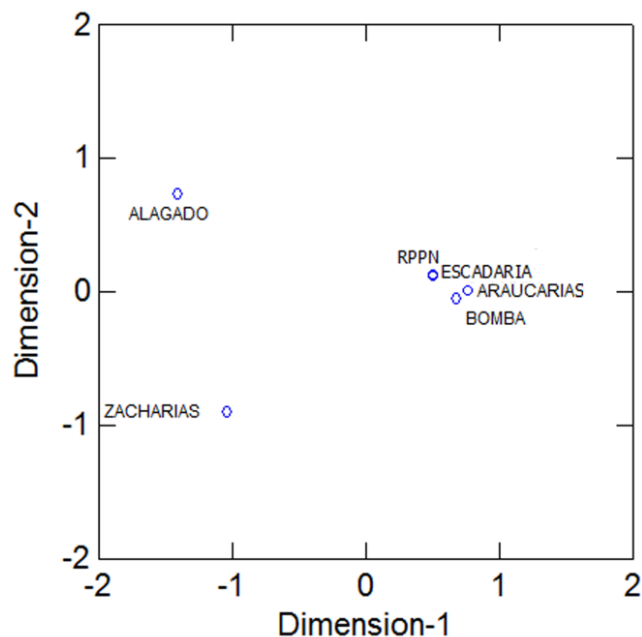


Figura 3.6. Gráfico NMDS (Escalonamento multidimensional) indicando a similaridade entre as áreas estudadas de acordo com as variáveis da paisagem.

#### *Comunidades de pequenos mamíferos*

A riqueza e abundância de espécies de roedores e marsupiais em cada área está apresentada na Tabela 3.3. As seis espécies mais abundantes (*Akodon serrensis*, *Akodon montensis*, *Akodon paranaensis*, *Oxymycterus judex*, *Oligoryzomys nigripes* e *Thaptomys nigrita*) ocorreram nas seis áreas de estudo enquanto que as outras oito espécies apresentaram baixas abundâncias. A área Bomba apresentou a maior riqueza, sendo que todas as 14 espécies capturadas no estudo ocorreram nesta área. As outras áreas de estudo apresentaram riqueza de espécies semelhantes entre si. Na área São Zacharias 10 dos 40 pontos de captura foram estabelecidos dentro da monocultura de Pinus. Desta forma, as seis espécies mais abundantes ocorreram neste ambiente. Com exceção de *O. nigripes*, todas as outras espécies apresentaram indivíduos da classe etária I (indivíduos jovens) dentro de reflorestamento de Pinus. Além disso, foram observadas uma fêmea prenhe de *A. serrensis*, duas de *A. paranaensis*, uma de *O. judex* e uma de *O. nigripes*,

Tabela 3.3 – Número total de animais capturados por espécie em cada área de estudo em General Carneiro/PR, de dezembro de 2009 a dezembro de 2011

Espécies	Áreas de Estudo					
	Araucárias	Bomba	RPPN	Escadaria	São Zacharias	Alagado
<b>Rodentia: Sigmodontinae</b>						
<i>Akodon serrensis</i>	44	101	43	49	144	20
<i>Akodon montensis</i>	4	52	75	67	29	26
<i>Akodon paranaensis</i>	17	8	1	14	34	13
<i>Oxymycterus judex</i>	95	61	24	14	79	21
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	5	12	16	17	11	12
<i>Thaptomys nigrita</i>	11	10	11	26	11	1
<i>Sooretamys angouya</i>	-	5	4	3	1	-
<i>Nectomys squamipes</i>	-	1	-	-	-	1
<i>Delomys dorsalis</i>	-	1	-	1	-	-
<i>Brucepattersonius iheringi</i>	-	2	-	-	-	-
<b>Didelphimorphia: Didelphinae</b>						
<i>Monodelphis dimidiata</i>	10	9	-	8	1	6
<i>Philander frenatus</i>	1	3	-	4	1	-
<i>Gracilinanus</i> sp.	-	1	3	-	-	1
<i>Lutreolina crassicaudata</i>	-	1	-	-	-	-
<b>Riqueza Sigmodontinae</b>	6	10	7	8	7	7
<b>Riqueza Didelphinae</b>	2	4	1	2	2	2
<b>Riqueza Total*</b>	<b>8</b>	<b>14</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
<b>Infecção por Hantavírus</b>						
<i>Akodon serrensis</i>	1	-	-	-	1	-
<i>Akodon montensis</i>	-	3	6	3	1	3
<i>Akodon paranaensis</i>	1	-	-	1*	-	3
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	1	-	-	1	-	1
Prevalência de JABV	<b>3.08%</b>	<b>1.86%</b>	<b>5.04%</b>	<b>2.31%</b>	<b>0.97%</b>	<b>10.17%</b>
Prevalência de JUQV	<b>4.55%</b>	-	-	<b>6.45%</b>	-	<b>4.00%</b>
Prevalência Total (JABV+JUQV)	<b>1.70%</b>	<b>1.19%</b>	<b>3.41%</b>	<b>2.62%</b>	<b>0.65%</b>	<b>7.45%</b>

\* *A. paranaensis* infectado por JUQV. Todos os outros espécimes de *A. paranaensis*, bem como de *A. serrensis* e *A. montensis*, estavam infectados por JABV. Todos os espécimes de *O. nigripes* estavam infectados por JUQV (Ver capítulo 2).



A partir da matriz de correlação foram eliminadas as variáveis de micro-habitat CHL, COB\_DOSS e OFV1 por estarem correlacionadas com outras. Foi analisada a preferência de micro-habitat para as seis espécies mais abundantes. As espécies *A. serrensis* e *A. montensis* apresentaram relação significativa com obstrução foliar vertical nos estratos de 0,5 a 1m de altura (OFV2) e de 1 a 1,5m de altura (OFV3). Enquanto a espécie *A. serrensis* (n = 63) apresentou associação positiva com a variável OFV2 (B = 0,532; p < 0,001), *A. montensis* (n = 25) apresentou relação negativa com a variável OFV3 (B = -0,663; p = 0,034). Entretanto *A. montensis* também apresentou relação positiva, embora marginalmente significativa, com a variável OFV2 (B = 0,463; p = 0,076). Em relação às outras espécies, a variável ALT\_DOSS foi relacionada negativamente com *O. judex* (n = 36) (B = -0,109; p = 0,026) enquanto que a variável ARA foi relacionada positivamente com *T. nigrita* (n = 17) (B = 2,928; p = 0,032). Nenhuma variável foi relacionada às espécies *A. paranaensis* (n = 17) e *O. nigripes* (n = 12).

O maior valor do índice de heterogeneidade foi encontrado na área menos preservada (São Zacharias) (Tabela 3.4). Altos índices de heterogeneidade foram também encontrados nas áreas Escadaria e Alagado. Já o índice de complexidade foi maior nas áreas RPPN e Bomba (Tabela 3.4). Nenhuma relação foi encontrada entre a composição de espécies e a heterogeneidade (r = -0,272; p = 0,324) ou a complexidade (r = -0,153; p = 0,568).

Tabela 3.4 – Índices de heterogeneidade e complexidade em cada uma das seis áreas de estudo, do município de General Carneiro/PR.

Área	Heterogeneidade	Complexidade
<b>Araucarias</b>	4.41	0.23
<b>Bomba</b>	4.97	0.37
<b>RPPN</b>	3.70	0.46
<b>Escadaria</b>	10.78	0.26
<b>São Zacharias</b>	13.84	0.33
<b>Alagado</b>	6.03	0.23

### *Análise de parâmetros de comunidades*

A análise de co-ocorrência das espécies a partir dos pontos de captura indicou segregação espacial (correlação negativa) entre *A. serrensis* e *A. montensis* em 8 das 9 expedições de coleta (Tabela 3.5). Outras associações indicando segregação espacial foram observadas, entretanto ocorreram em no máximo três expedições e em geral em épocas de alta populacional (Tabela 3.6):

Tabela 3.5. Análise de co-ocorrência entre *A. serrensis* e *A. montensis* no município de General Carneiro/PR.

<b>Expedição de Coleta</b>	<b>Valor de r</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Dezembro/2009</b>	-0.4493	0.0013
<b>Março/2010</b>	-0.3797	0.0011
<b>Junho/2010</b>	-0.325	< 0.0001
<b>Setembro/2010</b>	-0.2247	0.0094
<b>Dezembro/2010</b>	-0.3166	0.0033
<b>Março/2011</b>	-0.224	0.05
<b>Junho/2011</b>	-0.3084	0.0014
<b>Setembro/2011</b>	-0.0348	0.707
<b>Dezembro/2011</b>	-0.2625	0.0427

Tabela 3.6. Análise de co-ocorrência, entre as espécies capturadas no município de General Carneiro/PR.

<b>Espécies</b>	<i>A. serrensis</i>	<i>A. montensis</i>	<i>O. nigripes</i>	<i>T. nigrita</i>
<i>A. paranaensis</i>	<b>Setembro/2010</b> (r = -0.2544 p = 0.0031)	<b>Setembro/2010</b> (r = -0.1763 p = 0.0424)		
<i>O. judex</i>	<b>Junho/2010</b> (r = -0,2389 p = 0,0043)	<b>Março/2011</b> (r = -0.3308 p = 0.0033) <b>Setembro/2011</b> (r = -0.2197 p = 0.0163) <b>Dezembro/2011</b> (r = -0.3531 p = 0.0056)	<b>Junho/2011</b> (r = -0.2007 p = 0.041)	<b>Setembro/2011</b> (r = -0.1806 p = 0.0493)
<i>O. nigripes</i>	<b>Junho/2011</b> (r = -0.1994 p = 0.0423) <b>Setembro/2011</b> (r = -0.2346 p = 0.0102)			

Os resultados apresentados na Tabela 3.3 dão suporte ao padrão de segregação espacial entre *A. serrensis* e *A. montensis*. Nas áreas Araucárias, Bomba e São Zacharias a espécie *A. serrensis* foi mais abundante do que *A. montensis* enquanto que nas áreas RPPN, Escadaria e Alagado *A. montensis* foi mais abundante que *A. serrensis*.

A composição de espécies não apresentou associação com as variáveis da paisagem (Dimensão 1 do NMDS x Componentes 1 e 2 da PCA:  $R^2 = 0,211$ ;  $p = 0,70$ ; Dimensão 2 do NMDS x Componentes 1 e 2 da PCA:  $R^2 = 0,412$ ;  $p = 0,45$ ). Os Componentes 1 e 2 da PCA explicaram 58,7% e 21,1% da variação, respectivamente. O gráfico NMDS da abundância das espécies (Figura 3.7) não mostrou um agrupamento das áreas de acordo com o seu grau de conservação.

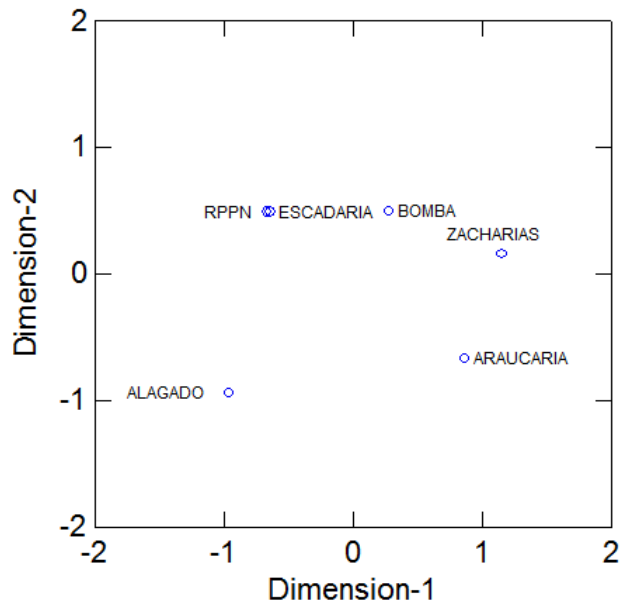


Figura 3.7. Gráfico NMDS (Escalonamento multidimensional) indicando a similaridade entre as áreas estudadas de acordo com a composição de espécies.

#### Análise de parâmetros da infecção por hantavírus

O número de espécimes infectados por hantavírus, a prevalência de infecção total e as prevalências de JABV e JUQV estão apresentadas na Tabela 3.3. Foi possível observar uma tendência à diminuição da prevalência de infecção total e por JABV, quanto maior era a abundância de *A. serrensis* (Tabela 3.3; Figura 3.8).

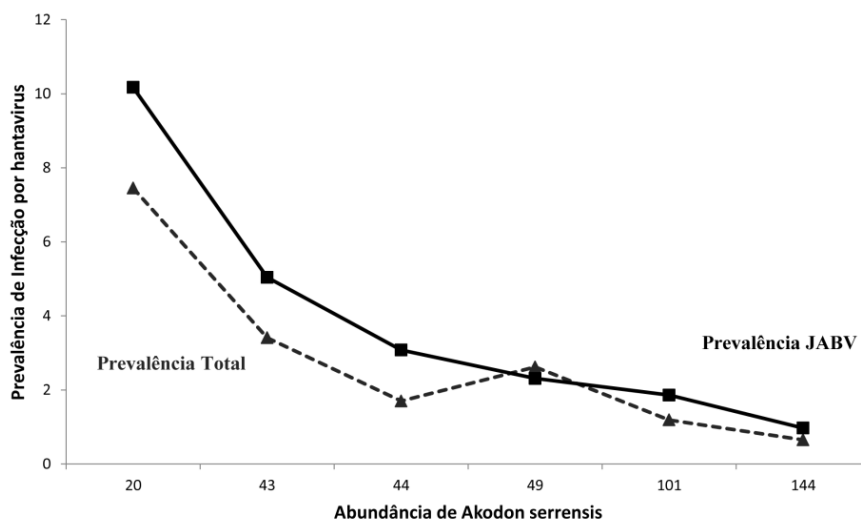


Figura 3.8. Prevalência de infecção por JABV e prevalência total de infecção por hantavírus de acordo com a abundância de *A. serrensis* em cada área de estudo.

A análise GLM corroborou esta tendência indicando uma correlação negativa entre infecção por JABV e abundância de *A. serrensis* (Tabela 3.7). Por outro lado, estas prevalências tendiam a aumentar quanto maior a abundância de *A. montensis* (Tabela 3.3). Além da abundância de *A. serrensis*, as variáveis espécie, sexo e classe etária também foram selecionadas no modelo descritivo de ocorrência de JABV em roedores silvestres. A espécie *A. montensis* apresentou a maior prevalência de infecção por hantavírus em relação às outras três espécies infectadas (*A. serrensis*, *A. paranaensis* e *O. nigripes*). A prevalência também foi maior em indivíduos machos da classe etária III (adultos). Desta forma, segundo o modelo descritivo, áreas com menores abundâncias de *A. serrensis* e com maior ocorrência de machos adultos de *A. montensis*, apresentam maior probabilidade de ocorrência de JABV. A Tabela 3.7 indica os valores de AIC do modelo nulo, seguido do modelo incluindo as variáveis selecionadas nas análises univariadas prévias e o modelo final selecionado após as análises *stepwise*.

Tabela 3.7. Modelo descritivo de ocorrência de hantavírus na região de estudo, baseado em seleção *stepwise* e no Critério de Informação de Akaike (AIC).  $\Delta$ AIC representa a diferença entre o AIC do valor de um modelo em relação ao modelo selecionado (de menor valor de AIC)

Genótipo	$\Delta$ AIC	AIC	Model	Hosmer-Lemeshow (HL)
JABV	59,98	221,51	Null Model	HL = 0,4627989 $p = 0.9999$
	12,11	174,64	Espécie + Sexo + Classe etária + Estação + Localidade + Condição reprodutiva + Temperatura + Abundância de <i>Akodon serrensis</i>	
	0	162,53	Espécie + Sexo + Classe etária + (-) Abundância de <i>Akodon serrensis</i>	
JUQV	2,41	58,05	Espécie	-
	0	55,64	Modelo Nulo	

Os dados de ocorrência de infecção por JUQV não puderam ser modelados devido ao baixo número amostral (n=4). É válido ressaltar que a análise univariada entre a variável dependente e a variável explicativa “Abundância de *Akodon serrensis*”, apresentou um nível de significância marginal ( $p = 0,07$ ), sugerindo que a mesma relação encontrada nas análises de JABV pode ocorrer em JUQV.

## DISCUSSÃO

### *Comunidade de pequenos mamíferos*

Em comparação com o estudo prévio realizado em General Carneiro, foram adicionadas à lista de espécies da região mais 3 espécies de roedores (*Nectomys squamipes*, *Delomys dorsalis* e *Brucepattersonius iheringi*) e 3 de marsupiais (*Philander frenatus*, *Gracilinanus* sp. e *Lutreolina crassicaudata*). Estas espécies ocorreram em baixas abundâncias e portanto, só foi possível detectá-las a partir do estudo de dois anos. As seis espécies mais abundantes (*Akodon serrensis*, *Akodon montensis*, *Akodon paranaensis*, *Oxymycterus judex*, *Oligoryzomys nigripes* e *Thaptomys nigrita*) ocorreram em todas as áreas de estudo corroborando o resultado encontrado no estudo prévio (Ver Capítulo 1), quando estas mesmas espécies foram encontradas tanto em mata nativa quanto na divisa entre mata nativa degradada e áreas de reflorestamento de Pinus. Outras espécies que ocorreram em ambos estudos foram o roedor *S. angouya* e o marsupial *M. dimidiata*. No estudo 2009-2011 estas espécies também foram encontradas nos dois tipos de áreas, apesar de não terem ocorrido em todas as seis áreas de estudo.

O roedor *N. squamipes* ocorreu apenas em áreas com presença de curso d’água (Bomba) ou brejo (Alagado), considerando seus hábitos semi-aquáticos (D’Andrea et al. 2007, Gentile et al. 2010). O roedor *Delomys dorsalis* foi registrado apenas em áreas de mata nativa, bem como o marsupial *Gracilinanus* sp. Apesar de *D. dorsalis* ser um roedor comum e abundante em outras regiões de Floresta Ombrófila Mista (Cademartori et al. 2004, 2005, 2008, Iob 2007), tendo sido inclusive relacionado a eventos de ratada no Estado de São Paulo (Jaksic & Lima 2003), esta espécie apresentou apenas dois indivíduos nas áreas amostradas. É uma espécie considerada especialista na ocupação do habitat, estando relacionada à habitats preservados (Dalmagro & Vieira 2005, Perini 2010). Outros estudos indicaram a presença de

*D. dorsalis* em áreas de floresta com baixa densidade de Araucárias e em áreas de campo alagadiço (Cademartori et al. 2002, Marques et al. 2011).

O roedor *B. iheringi* e o marsupial *L. crassicaudata* só ocorreram em uma área mais preservada (Bomba), sendo este último capturado em borda de córrego. Segundo outros autores, *L. crassicaudata* é de fato, uma espécie mais comumente encontrada em habitats próximos de cursos d'água ou de várzea (Bonvicino et al. 2002, Monteiro-filho et al. 2006). *Brucepattersonius iheringi* foi também reportado em baixa abundância, em áreas protegidas de Floresta com Araucárias no Rio Grande do Sul (Pedó et al. 2010). Outro marsupial que habita áreas próximas a cursos d'água é *P. frenatus*. Esta espécie foi encontrada próxima de córregos nas áreas Escadaria e Bomba, entretanto foi capturada também em áreas sem a ocorrência de cursos d'água (São Zacharias). *Philander frenatus* é uma espécie considerada comum e sem restrição no uso de habitat (Bonvicino et al. 2002), sendo encontrada em áreas alteradas (matrizes de áreas fragmentadas, áreas de agricultura e plantação de *Eucalyptus* sp.) ou contínuas de Mata Atlântica (Gentile et al. 2000, Silva 2001, Pires et al. 2002, D'Andrea et al. 2007, Lira et al. 2007, Freitas et al. 2009, Prevedello et al. 2009, Passamani & Ribeiro 2009, Rossi 2011).

Apesar de alguns autores indicarem que áreas de reflorestamento de Pinus são menos exploradas pela fauna por serem mais empobrecidas e apresentarem sub-bosque pouco estruturado (Rosa & Vieira 2010, Bovolenta et al. 2011), as seis espécies mais abundantes do estudo foram capturadas dentro destes ambientes. Estas espécies apresentaram indivíduos jovens e/ou fêmeas prenhes capturadas dentro de monoculturas de Pinus, indicando que estão efetivamente colonizando este habitat. Alguns estudos reportam ainda, a capacidade de determinadas espécies de roedores se alimentarem de sementes ou casca de Pinus, o que pode ser mais um indício de colonização deste ambiente (Gonçalves et al. 2007a, Vieira et al. 2011). Fonseca et al. (2009), em estudo comparativo da biodiversidade em área de Floresta Ombrófila Mista, destacou a importância das monoculturas de Pinus como habitats alternativos de algumas espécies de áreas florestadas, entretanto demonstrou que estes ambientes possuem uma menor biodiversidade e identificou quase 40% de espécies exclusivas de Floresta Ombrófila Mista em florestas nativas de Araucárias.

Contudo, em General Carneiro, a presença destas seis espécies em áreas modificadas por Pinus pode estar relacionada a presença de remanescentes de mata nativa no seu entorno. No estudo de Rosa & Vieira (2010), por exemplo, a presença de espécies silvestres foi reduzida em áreas de *P. elliottii* mais afastadas de matas nativas.

### *Análise de parâmetros de comunidades*

O índice de heterogeneidade foi mais alto na área modificada por Pinus (São Zacharias). Em alguns casos a modificação do ambiente pode resultar em ambientes mais heterogêneos, sendo um indicador de áreas de borda ou perturbações no interior das áreas de floresta. Os índices de complexidade não apresentaram variação entre as áreas de estudo de acordo com o grau de conservação. Este índice pode variar não apenas com o número de estratos verticais, mas também com a distribuição da vegetação ao longo destes estratos (Gentile & Fernandez 1999). Assim, as áreas que apresentaram menor complexidade (Araucárias e Alagado) foram aquelas que não apresentaram um adensamento da vegetação nos estratos mais baixos e intermediários, apesar da presença de árvores de grande porte.

A abundância das espécies não apresentou associação com as variáveis da paisagem, tampouco um padrão de similaridade em relação ao grau de conservação das áreas. Da mesma forma, a composição de espécies não apresentou associação com a heterogeneidade e complexidade. Estes resultados sugerem que o grau de conservação não influenciou a riqueza, a composição e a abundância das espécies de roedores e que as áreas não foram suficientemente heterogêneas a ponto de gerar uma diferença significativa nas comunidades de roedores.

De fato, as seis espécies mais abundantes foram encontradas em todas as seis áreas de coleta, sugerindo uma homogeneidade das áreas em relação à ocorrência das espécies mais abundantes (Tabela 3.3). Foi possível observar durante o estudo, que mesmo as áreas consideradas mais preservadas apresentavam evidências de atividade humana. A área Araucárias, apesar de ser a mais afastada das áreas de plantio de Pinus, apresentou durante o estudo a coleta seletiva de Erva-Mate em alguns pontos e a área Bomba, apesar de apresentar a maior riqueza de espécies do estudo, era cortada por uma trilha por onde trabalhadores da madeireira transitavam em anos anteriores aos deste estudo. Além disso, as áreas Bomba e RPPN, apesar de não apresentarem indícios de manejo durante o período do estudo, estavam próximas de áreas de plantio de Pinus. A área Bomba apresentou a maior riqueza de espécies, entretanto as abundâncias das espécies exclusivas ou compartilhadas com até duas áreas eram muito baixas (Tabela 3.3).

Segundo (Pardini et al. 2010) fragmentos florestais em uma paisagem com alta cobertura de vegetação nativa são capazes de manter populações tanto em fragmentos pequenos quanto em fragmentos grandes devido a maior proximidade entre os remanescentes.



Efeito semelhante pode estar ocorrendo em nossa região de estudo, não somente pela sua alta porcentagem de vegetação nativa em comparação com outras regiões do Estado (SOSMA 2012), mas também por não haver uma matriz de vegetação aberta como é o caso da maioria das áreas fragmentadas em Mata Atlântica. A região de General Carneiro é um mosaico de remanescentes de vegetação nativa (Floresta com Araucárias) e áreas modificadas por plantio de Pinus que podem estar realizando um papel importante na manutenção de algumas espécies (Fonseca et al. 2009).

#### *Estudo do Micro-habitat*

O padrão de ocupação do micro-habitat mostrou uma diferença na ocorrência de *A. serrensis* e *A. montensis* uma vez que estas espécies apresentaram padrões diferentes em relação a variável Obstrução Foliar Vertical, *A. serrensis* apresentando associação com pontos de maior adensamento de vegetação entre 0,5 e 1m (OFV2) e *A. montensis* com menor adensamento de obstrução foliar entre 1 e 1,5m (OFV3). Entretanto *A. montensis* também apresentou correlação marginalmente significativa com OFV2, sugerindo que em alguns momentos possa haver sobreposição de micro-habitat com *A. serrensis*. Entretanto este tipo de habitat não parece ser preferencial considerando que estas espécies apresentam segregação espacial na maior parte do tempo. Estes resultados podem estar relacionados a uma associação preferencial de *A. montensis* a habitats aonde haja menor probabilidade de competição com *A. serrensis*.

Em outros estudos, *A. montensis* apresentou preferência de micro-habitat variando de áreas com baixa cobertura de dossel e/ou densa cobertura vegetal próxima ao solo (Püttker et al. 2008b, Goodin et al. 2009), até áreas com maior cobertura de dossel (Dalmagro & Vieira 2005), corroborando os hábitos generalistas desta espécie.

A espécie *O. judex* apresentou associação negativa à altura do dossel, sugerindo preferência por áreas de vegetação mais baixa e menos complexas, enquanto que *T. nigrita* apresentou associação com a quantidade de Araucárias, indicando preferência por habitats com presença de mata nativa.

### *Co-ocorrência de espécies*

As análises de co-ocorrência apresentaram segregação espacial entre as seis espécies mais abundantes ao longo dos dois anos de estudo, reforçando os resultados encontrados que indicam separação entre algumas espécies a partir do habitat. Em geral estas associações ocorreram em períodos de alta populacional (Junho e Setembro), sugerindo que a segregação entre as espécies está relacionada a um fator estacional. Nestas épocas há maior adensamento populacional e conseqüentemente pode haver maior probabilidade de competição entre as espécies. É válido ressaltar que estas análises não indicam a exclusão de uma espécie pela outra e sim a menor abundância de uma dada espécie em pontos de maior abundância de outra. Esta relação foi melhor observada para as espécies *A. serrensis* e *A. montensis*, cuja relação de segregação espacial foi significativa em 8 das 9 expedições realizadas, corroborando os resultados de preferência por micro-habitat. Estas análises, indicam portanto, um padrão predominante de separação de habitat entre estas duas espécies, podendo haver sobreposição em certos momentos.

Estes resultados reforçam a distribuição observada das abundâncias destas espécies em relação às áreas de estudo, sendo *A. serrensis* mais abundante em Araucárias, Bomba e São Zacharias, e *A. montensis* mais abundante em RPPN, Escadaria e Alagado.

### *Análise de parâmetros da infecção por hantavírus*

Este padrão se refletiu também na ocorrência de infecção por hantavírus, sendo o modelo de ocorrência de JABV inversamente relacionado à abundância de *A. serrensis*, de modo que quanto menor a abundância desta espécie maior a probabilidade de ocorrência de JABV. O modelo descritivo de ocorrência de JABV em roedores silvestres indicou ainda correlação com as variáveis Espécie (*A. montensis*), Sexo (machos) e Classe Etária (Classe III = adultos). Este modelo corrobora outros estudos que indicam que a infecção ocorre principalmente durante a época reprodutiva (Escutenaire et al. 2002), devido ao comportamento agonístico, mais comum em machos adultos (Boone et al. 1998, Yahnke et al. 2001, Mills et al. 2007, Piudo et al. 2011, Vadell et al. 2011). Segundo Klein et al. (2004) *Rattus norvegicus* infectados com o genótipo de hantavírus Seoul são mais agressivos que machos não infectados. Além disso, Lehmer et al. (2007) reportaram menor imunocompetência em machos de *Peromyscus maniculatus*, hospeiro do genótipo de

hantavírus Sin Nombre, sugerindo maior suscetibilidade em machos em comparação com fêmeas.

Resultado semelhante foi encontrado por Oliveira (2012) em estudo realizado na Floresta com Araucárias de Santa Catarina, indicando abundância de *A. montensis* e sexo (machos) como principais variáveis relacionadas à ocorrência de JABV. Já Orrock et al. (2011), encontrou relação entre ocorrência de hantavírus e pluviosidade, tamanho da área e menor presença de predadores em ilhas na costa da Califórnia.

Apesar do modelo proposto estar adequado para compreensão da dinâmica de transmissão do hantavírus entre os hospedeiros silvestres, modelos determinantes de risco de ocorrência de SPH devem também levar em consideração as atividades humanas de risco (Goodin et al. 2009). A hipótese do efeito diluidor não foi confirmada nas áreas de estudo considerando que o modelo descritivo não indicou influência da riqueza de espécies na ocorrência de infecção.

As relações *spillover* encontradas podem ser explicadas de acordo com as características das áreas de estudo, do micro-habitat e da co-ocorrência das espécies. No caso do *spillover* *A. serrensis*/JABV, apesar de esta espécie ter sido encontrada infectada em duas das três áreas em que sua abundância foi maior que a de *A. montensis* (Araucárias e São Zacharias), sua infecção não parece estar relacionada com a abundância já que um dos dois *spillovers* ocorreu em uma época de baixas populacionais (Dezembro/2009). *Akodon serrensis* e *A. montensis* (hospedeiro primário de JABV), apresentaram segregação espacial e diferentes preferências de micro-habitat. Entretanto, a ocorrência de sobreposição de habitats, embora não predominante, pode ser determinante para a infecção *spillover* em *A. serrensis*. Segundo Allen et al. (2009), este tipo de infecção é mais provável de ocorrer quando há sobreposição no habitat. Roedores em estresse competitivo e que venham a ocupar habitats menos preferenciais, o que pode ser o caso dos espécimes de *A. montensis* de General Carneiro, podem apresentar mudanças comportamentais, como por exemplo aumento na agressividade, aumentando com isso a probabilidade de transmissão intra e interespecífica do hantavírus (Goodin et al. 2009)

Em relação ao *spillover* *A. paranaensis*/JABV, esta espécie foi encontrada infectada por JABV em duas áreas (Araucárias e Alagado), concentrando três dos quatro indivíduos infectados na área Alagado. Este *spillover* pode estar relacionado a recorrente ocorrência de alagamento em alguns pontos desta área, o que pode diminuir os habitats disponíveis fazendo com que haja sobreposição entre *A. paranaensis* e o hospedeiro primário de JABV, *A.*

*montensis*. De fato a única relação de segregação espacial encontrada nestas espécies ocorreu em Setembro/2010, época de menor pluviosidade na região e subsequente a uma grande enchente na área Alagado ocorrida em Março/2010.

A única infecção *spillover* encontrada entre *A. paranaensis*/JUQV, se deu em uma área aonde *O. nigripes*, hospedeiro primário de JUQV foi também encontrado infectado, entretanto não foi possível determinar a importância desta relação a partir das análises de co-ocorrência e de micro-habitat.

Três das seis áreas estudadas foram também amostradas no estudo prévio realizado em 2006 (Bomba, Escadaria e São Zacharias). Duas destas, Escadaria e São Zacharias, já haviam apresentado roedores infectados. Em São Zacharias fora encontrado um *A. montensis* infectado por JABV e em Escadaria um *A. montensis* infectado por JUQV. No estudo realizado em 2009-2011 um *spillover* de *A. paranaensis*/JUQV foi encontrado nesta mesma área, demonstrando a provável ocorrência de interação entre estas espécies e o hospedeiro primário de JUQV (*Oligoryzomys nigripes*), também encontrado infectado em Escadaria.

## CONCLUSÕES

- As principais espécies hospedeiras de hantavírus no Estado do Paraná são os roedores *Akodon montensis* e *Oligoryzomys nigripes*, associados aos genótipos virais Jaborá Vírus (JABV) e Juquitiba Vírus (JUQV), respectivamente.
- A dinâmica de infecção por hantavírus nos roedores silvestres apresenta um padrão estacional e relacionado ao sexo e a idade dos roedores (machos adultos), de modo que maiores prevalências são observadas na primavera/verão.
- As seis espécies mais abundantes de roedores (*Akodon serrensis*, *Oxymycterus judex*, *Akodon montensis*, *Akodon paranaensis*, *Oligoryzomys nigripes* e *Thaptomys nigrita*) apresentaram dinâmica populacional semelhante (maior atividade reprodutiva, maior quantidade de indivíduos adultos e menores tamanhos populacionais na primavera/verão).
- O grau de preservação das áreas de estudo na Floresta Ombrófila Mista, não influenciou a composição de espécies, demonstrando uma homogeneidade entre as áreas.
- A infecção *spillover* entre *A. serrensis* e *A. montensis* está relacionada a ocupação do micro-habitat por estas espécies.
- Infecções *spillover* ocorrem em períodos de baixa prevalência nos hospedeiros primários, sendo importantes na manutenção dos genótipos JABV e JUQV no ambiente.
- A infecção por JABV em roedores está relacionada à uma menor abundância de *A. serrensis*, à presença de roedores machos adultos e à ocorrência da espécie *A. montensis* nas áreas de estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrellos R, Bonvicino CR, Rosa EST, Marques AAR, D'Andrea PS, Weksler M 2012. The taxonomic status of the Castelo dos Sonhos Hantavirus reservoir. *Zootaxa* 3220: 1–28.
- Alho CJR 2005. Intergradation of habitats of non-volant small mammals in the patchy Cerrado landscape. *Arquivos do Museu Nacional* 63: 41–48.
- Allen LJS, Wesley CL, Owen RD, Goodin DG, Koch D, Jonsson CB, Chu Y-K, Shawn Hutchinson JM, Paige RL 2009. A habitat-based model for the spread of hantavirus between reservoir and spillover species. *Journal of theoretical biology* 260: 510–522.
- Andreo V, Provencal C, Levis S, Pini N, Enría D, Polop J 2012. Summer–autumn distribution and abundance of the hantavirus host, *Oligoryzomys longicaudatus*, in northwestern Chubut, Argentina. *Journal of Mammalogy* 93: 1559–1568.
- Anisimova M, Gascuel O 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic biology* 55: 539–552.
- Anthony SJ, Epstein JH, Murray KA, Navarrete-Macias I, Zambrana-Torrel CM, Solovyov A, Ojeda-Flores R, Arrigo NC, Islam A, Khan SA, Hosseini P, Bogich TL, Olival KJ, Sanchez-Leon MD, Karesh WB, Goldstein T, Luby SP, Morse SS, Mazet JAK, Daszak P, Lipkin I 2013. A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *mBio* 4: e00598–13.
- Antunes PC, Campos MAA, Oliveira-Santos LGR, Graipel ME 2010. Population dynamics of *Akodon montensis* (Rodentia, Cricetidae) in the Atlantic forest of Southern Brazil. *Mammalian Biology - Zeitschrift fur Säugetierkunde* 75: 186–190.
- Arai S, Song J, Sumibcay L, Bennett SN, Nerurkar VR, Parmenter C, Cook JA, Yates TL, Yanagihara R 2007. Hantavirus in Northern Short-tailed Shrew, United States. *Emerging Infectious Diseases* 13: 1420–1423.
- Araujo J, Pereira A, Nardi MS, Henriques DA, Lautenschlager DA, Dutra LM, Ometto TL, Hurtado RF, Maués F, Nava A, Morais FA, Aires CC, Favorito S, Durigon EL 2011.

Detection of hantaviruses in Brazilian rodents by SYBR-Green-based real-time RT-PCR. *Archives of Virology* 156: 1269–1274.

Araujo J, Thomazelli LM, Henriques DA, Lautenschlager D, Ometto T, Dutra LM, Aires CC, Favorito S, Durigon EL 2012. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. *BMC research notes* 5: 690.

Armién AG, Armién B, Koster F, Pascale JM, Avila M, Gonzalez P, Cruz M, Zaldivar Y, Mendoza Y, Gracia F, Hjelle B, Lee S-J, Yates TL, Salazar-Bravo J 2009. Hantavirus infection and habitat associations among rodent populations in agroecosystems of Panama: implications for human disease risk. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 81: 59–66.

August P V 1983. The Role of Habitat Complexity and Heterogeneity in Structuring Tropical Mammal Communities. *Ecology* 64: 1495–1507.

Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AS 2007. *Bioestat – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Ong Mamirauá, Belém/PA, Brasil.

Baladrón A V, Malizia AI, Bó MS, Liébana MS, Bechard MJ 2012. Population dynamics of the southern short-tailed opossum (*Monodelphis dimidiata*) in the Pampas of Argentina. *Australian Journal of Zoology* 60: 238–245.

Boldrini II 2009. *Biodiversidade dos Campos do Planalto das Araucárias*. MMA, Brasília/DF, Brasil.

Bonecker ST, Portugal LG, Costa-Neto SF, Gentile R 2009. A long term study of small mammal populations in a Brazilian agricultural landscape. *Mammalian Biology - Zeitschrift fur Saugetierkunde* 74: 467–477.

Bonvicino CR 2011. Diversidade cariotípica em roedores Akodontini do Brasil. *Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia* 62: 7–11.

Bonvicino CR, Lima JFS, Almeida FC 2003. A new species of *Calomys* Waterhouse (Rodentia, Sigmodontinae) from the Cerrado of Central Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 20: 301–307.

- Bonvicino CR, Lindbergh SM, Maroja LS 2002. Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic forest and Cerrado: comments on their potential use for monitoring environment. *Brazilian Journal of Biology* 62: 765–774.
- Bonvicino CR, Oliveira JA de, D'Andrea PS 2008. Guia dos roedores do Brasil , com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, Rio de Janeiro/RJ, Brasil.
- Boone JD, Otteson EW, McGwire KC, Villard P, Rowe JE, St Jeor SC 1998. Ecology and demographics of hantavirus infections in rodent populations in the Walker River Basin of Nevada and California. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59: 445–451.
- Bovolenta YR, Perina BB, Rosa VPP, Liboni AP, Rodrigues DR, Pimenta JA, Bianchini E 2011. Remoção de propágulos em fragmento de floresta nativa e reflorestamentos numa região de Floresta Ombrófila Mista do estado do Paraná. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* 32: 29–40.
- Briani DC, Palma ART, Vieira EM, Henriques RPB 2004. Post-fire succession of small mammals in the Cerrado of central Brazil. *Biodiversity and Conservation* 13: 1023–1037.
- Cademartori CV, Fabián ME, Menegheti JO 2004. Variações na abundância de roedores (Rodentia, Sigmodontinae) em duas áreas de floresta ombrófila mista, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoociências* 6: 147–167.
- Cademartori CV, Fabián ME, Menegheti JO 2005. Biologia reprodutiva de *Delomys dorsalis* (Hensel, 1872) - Rodentia, Sigmodontinae - em área de floresta ombrófila mista, Rio Grande do Sul, Brasil. *Mastozoología Neotropical* 12: 133–144.
- Cademartori CV, Marques RV, Pacheco SM, Baptista LR de M, Garcia M 2002. Roedores ocorrentes em Floresta Ombrófila Mista (São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul) e a caracterização de seu habitat. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia PUCRS, Sér. Zoologia* 15: 61–86.
- Cademartori CV, Saraiva M, Saraiva C, Miranda JA de 2008. Nota sobre a fauna de pequenos roedores em mosaico antropogênico com remanescente florestal do domínio Mata Atlântica, Sul do Brasil. *Biodiversidade Pampeana* 6: 34–38.



- Calderón G, Pini N, Bolpe J, Levis S, Mills J, Segura E, Guthmann N, Cantoni G, Becker J, Fonollat A, Ripoll C, Bortman M, Benedetti R, Enria D 1999. Hantavirus reservoir hosts associated with peridomestic habitats in Argentina. *Emerging Infectious Diseases* 5: 792–797.
- Calisher CH, Sweeney W, Mills JN, Beaty BJ 1999. Natural history of Sin Nombre virus in western Colorado. *Emerging infectious diseases* 5: 126–134.
- Carmignotto AP 2004. Pequenos mamíferos terrestres do Cerrado: padrões faunísticos locais e regionais. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade de São Paulo: 404p.
- Carroll DS, Mills JN, Montgomery JM, Bausch DG, Blair PJ, Burans JP, Felices V, Gianella A, Iihoshi N, Nichol ST, Olson JG, Rogers DS, Salazar M, Ksiazek TG 2005. Hantavirus pulmonary syndrome in Central Bolivia: relationships between reservoir hosts, habitats, and viral genotypes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72: 42–46.
- Casapia M, Mamani E, Garcia MP, Miraval ML, Valencia P, Quino AH, Álvarez C, Donaires LF 2012. Síndrome pulmonar por hantavirus (Virus Río Mamoré) en la Amazonía Peruana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 29: 390–395.
- Cerqueira R, Freitas SR 1999. A new study method of microhabitat structure of small mammals. *Revista Brasileira de Biologia* 59: 219–223.
- Cerqueira R, Gentile R, Fernandez FAS, D'Andrea PS 1993. A five-year population study of an assemblage of small mammals in Southeastern Brazil. *Mammalia* 57: 507–517.
- Chan YC, Wong TW, Yap EH 1987. Haemorrhagic fever with renal syndrome: clinical, virological and epidemiological perspectives. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 16: 696–701.
- Christoff AU, Fagundes V, Sbalqueiro IJ, Mattevi MS, Yonenaga-Yassuda Y 2000. Description of a new species of Akodon (Rodentia: Sigmodontinae) from Southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 81: 838–851.
- Chu YK 2009. Sympatry of 2 Hantavirus Strains, Paraguay, 2003–2007. *Emerging Infectious Diseases* 15: 2007–2010.

- Clay CA, Lehmer EM, St Jeor S, Dearing MD 2009. Testing mechanisms of the dilution effect: deer mice encounter rates, Sin Nombre virus prevalence and species diversity. *EcoHealth* 6: 250–259.
- Costa LP, Leite YLR, Patton JL 2003. Phylogeography and systematic notes on two species of Gracile Mouse Opossums, Genus *Gracilinanus* (Marsupialia: Didelphidae) From Brazil. *Proceedings of The Biological Society of Washington* 116: 275–292.
- Creighton GK, Gardner AL 2008. Genus *Gracilinanus* Gardner & Creighton, 1989. In: Gardner AL (Ed.), *Mammals of South America, Vol. 1: Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*, The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA, pp. 43–50.
- D’Andrea PS, Gentile R, Cerqueira R, Grelle CE V, Horta C, Rey L 1999. Ecology of small mammals in a Brazilian rural area. *Revista Brasileira de Zoologia* 16: 611–620.
- D’Andrea PS, Gentile R, Maroja LS, Fernandes FA, Coura R, Cerqueira R 2007. Small mammal populations of an agroecosystem in the Atlantic Forest domain, southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 67: 179–186.
- Dalmagro AD, Vieira EM 2005. Patterns of habitat utilization of small rodents in an area of Araucaria forest in Southern Brazil. *Austral Ecology* 30: 353–362.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD 2000. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science (New York, N.Y.)* 287: 443–449.
- Dearing MD, Disney LJ 2010. Ecology of hantavirus in a changing world. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1195: 99–112.
- Delfraro A, Tomé L, D’Elía G, Clara M, Achával F, Russi JC, Rodonz JRA 2008. Juquitiba-like hantavirus from 2 nonrelated rodent species, Uruguay. *Emerging infectious diseases* 14: 1447–1451.
- Dias M, Mikich SB 2006. Levantamento e conservação da mastofauna em um remanescente de Floresta Ombrófila Mista, Paraná, Brasil. *Pesquisa Florestal brasileira - Embrapa* 52: 61–78.

- Dizney LJ, Ruedas LA 2009. Increased host species diversity and decreased prevalence of Sin Nombre Virus. *Emerging Infectious Diseases* 15: 1012–1018.
- Donalisio MR, Peterson AT 2011. Environmental factors affecting transmission risk for hantaviruses in forested portions of Southern Brazil. *Acta tropica* 119: 125–130.
- Edgar RC 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32: 1792–1797.
- Enria DAM, Levis SC 2004. Zoonosis virales emergentes: las infecciones por hantavirus Introducción e historia. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 23: 595–611.
- Escutenaire S, Chalon P, Jaegere F, Karelle-bui L, Mees G, Brochier B, Rozenfeld F, Pastoret P 2002. Behavioral, physiologic, and habitat influences on the dynamics of Puumala Virus infection in Bank Voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerging infectious diseases* 8: 930–936.
- Fahrig L, Paloheimo J 1988. Effects of spatial arrangement of habitat patches on local population size. *Ecology* 69: 468–475.
- Fayer R 2000. Global change and emerging infectious diseases. *The Journal of parasitology* 86: 1174–1181.
- Feliciano BR, Fernandez FAS, Freitas D, Figueiredo MSL 2002. Population dynamics of small rodents in a grassland between fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Mammalian Biology - Zeitschrift fur Saugetierkunde* 67: 304–314.
- Figueiredo GG, Borges AA, Campos GM, Machado AM, Saggiaro FP, Sabino Jr. GS, Badra SJ, Ortiz AAA, Figueiredo LTM 2010. Diagnosis of hantavirus infection in humans and rodents in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43: 348–354.
- Figueiredo LTM, Moreli ML, Borges AA, Figueiredo GG, Badra SJ, Bisordi I, Suzuki A, Capria S, Padula P 2009a. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on Araraquara virus recombinant nucleocapsid protein. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 81: 273–276.

- Figueiredo LTM, Moreli ML, Sousa RLM, Borges AA, Figueiredo GG, Machado AM, Bisordi I, Nagasse-Sugahara TK, Suzuki A, Pereira LE, Souza RP, Souza LTM, Braconi CT, Harsi CM, Zanotto PM de A 2009b. Hantavirus pulmonary syndrome, central plateau, southeastern, and southern Brazil. *Emerging infectious diseases* 15: 561–567.
- Firth C, Tokarz R, Simith DB, Nunes MRT, Bhat M, Rosa EST, Medeiros DBA, Palacios G, Vasconcelos PFC, Lipkin WI 2012. Diversity and distribution of hantaviruses in South America. *Journal of virology* 86: 13756–13766.
- Fonseca CR, Ganade G, Baldissera R, Becker CG, Boelter CR, Brescovit AD, Campos LM, Fleck T, Fonseca VS, Hartz SM, Joner F, Käffer MI, Leal-zanchet AM, Marcelli MP, Mesquita AS, Mondin CA, Paz CP, Petry M V, Piovensan FN, Putzke J, Stranz A, Vergara M, Vieira EM 2009. Towards an ecologically-sustainable forestry in the Atlantic Forest. *Biological Conservation* 142: 1209–1219.
- Fonseca GAB, Kierulff MCM 1989. Biology and natural history of Brazilian Atlantic forest small mammals. *Bulletin of the Florida State Museum. Biological Sciences* 34: 99–152.
- Freitas SR, Cerqueira R, Vieira M V 2002. A device and standard variables to describe microhabitat structure of small mammals based on plant cover. *Brazilian Journal of Biology* 62: 795–800.
- Freitas TRO, Gonçalves GL, Cunha AS, Stolz JF, Marinho JR 2009. Fauna Terrestre: Mamíferos. In: Boldrini II (Ed.), *Biodiversidade dos campos do planalto das Araucárias*, MMA, Brasília, Brasil, pp. 209–223.
- Galiano D, Kubiak BB, Marinho JR, Freitas TRO 2013. Population dynamics of *Akodon montensis* and *Oligoryzomys nigripes* in an Araucaria forest of Southern Brazil. *Mammalia* 77: 173–179.
- Gentile R, Costa-Neto SF, D’Andrea PS 2010. Uma revisão sobre a participação do rato d’água *Nectomys Squamipes* na dinâmica de transmissão da Esquistossomose Mansônica: um estudo multidisciplinar de longo prazo em uma área endêmica. *Oecologia Australis* 14: 711–725.

- Gentile R, D'Andrea PS, Cerqueira R, Maroja LS 2000. Population dynamics and reproduction of marsupials and rodents in a Brazilian rural area: a five-year study. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 9: 1–9.
- Gentile R, Fernandez FAS 1999. Influence of habitat structure on a streamside small mammal community in a Brazilian rural area. *Mammalia* 63: 29–40.
- Gheler-Costa C, Vettorazzi CA, Pardini R, Verdade LM 2012. The distribution and abundance of small mammals in agroecosystems of southeastern Brazil. *Mammalia* 76: 185–191.
- Glass GE, Childs JE, Korch GW, Leduc JW 1988. Association of intraspecific wounding with hantaviral infection in wild rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiology and Infection* 101: 459–472.
- Gonçalves GL, Faria-correa MA, Cunha AS, Freitas TRO 2007a. Bark consumption by the spiny rat *Euryzomatomys spinosus* (G. Fischer) (Echimyidae) on a *Pinus taeda* Linnaeus (Pinaceae) plantation in South Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 24: 260–263.
- Gonçalves PR, Meyers P, Vilela JF, Oliveira JA 2007b. Systematics of species of the genus *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) in Southeastern Brazil and implications for the biogeography of the Campos de Altitude. *Miscellaneous Publications - Museum of Zoology, University of Michigan* 197: 1–24.
- Goodin DG, Koch DE, Owen RD, Chu Y, Hutchinson JMS, Jonsson CB 2006. Land cover associated with hantavirus presence in Paraguay. *Global Ecology and Biogeography*: 519–527.
- Goodin DG, Paige R, Owen RD, Ghimire K, Koch DE, Chu YK, Jonsson CB 2009. Microhabitat characteristics of *Akodon montensis*, a reservoir for hantavirus, and hantaviral seroprevalence in an Atlantic forest site in eastern Paraguay. *Journal of Vector Ecology* : journal of the Society for Vector Ecology 34: 104–113.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27: 221–224.

- Graipel ME, Cherem JJ, Monteiro-Filho ELA, Glock L 2006. Dinâmica populacional de marsupiais e roedores no Parque Municipal da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. *Mastozoología Neotropical* 13: 31–49.
- Guo W-P, Lin X-D, Wang W, Tian J-H, Cong M-L, Zhang H-L, Wang M-R, Zhou R-H, Wang J-B, Li M-H, Xu J, Holmes EC, Zhang Y-Z 2013. Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS Pathog.* 9: e1003159.
- Guterres A, Oliveira RC, Fernandes J, D'Andrea PS, Bonvicino CR, Bragagnolo C, Guimarães GD, Almada GL, Machado RR, Lavocat M, Elkhoury MDR, Schrago CG, Lemos ERS 2013. Phylogenetic analysis of the S segment from Jujutiba hantavirus: Identification of two distinct lineages in *Oligoryzomys nigripes*. *Infection, Genetics and Evolution* 18: 262–268.
- Henriques RPB, Briani DC, Palma ART, Vieira EM 2006. A simple graphical model of small mammal succession after fire in the Brazilian cerrado. *Mammalia* 70: 226–230.
- Hinson ER, Shone SM, Zink MC, Glass GE, Klein SL 2004. Wounding: the primary mode of Seoul Virus transmission among male Norway Rats. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 70: 310–317.
- Hjelle B, Jenison S, Torrez-Martinez N, Yamada T, Nolte K, Zumwalt R, Malcenes K, Myers G 1994. A Novel Hantavirus Associated with an Outbreak of Fatal Respiratory Disease in the Southwestern United States: Evolutionary Relationships to Known Hantaviruses. *Journal of Virology* 68: 592–596.
- Hjelle B, Torres-Pérez F 2010. Hantaviruses in the Americas and Their Role as Emerging Pathogens. *Viruses* 2: 2559–2586.
- IAP, Instituto Ambiental do Paraná 2002. Plano de Manejo do Parque Estadual do Cerrado. Governo do Estado do Paraná - Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos - Instituto Ambiental do Paraná, Curitiba/PR, Brasil.
- IBAMA 1999. Plano de Manejo do Parque Nacional do Iguaçu. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Brasília/DF, Brasil.

- IBGE 2004. Mapa de vegetação do Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro/RJ, Brasil.
- Iob G 2007. Influência de frutos e sementes na abundância de pequenos mamíferos e a sua relação com a predação e dispersão de sementes da Araucária (*Araucaria angustifolia*). Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ecologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul: 53p.
- Jackson, A. P., & Charleston, M. A. (2004). A cophylogenetic perspective of RNA-virus evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 21(1), 45–57.
- Jaksic FM, Lima M 2003. Myths and facts on ratadas: Bamboo blooms, rainfall peaks and rodent outbreaks in South America. *Austral Ecology* 28: 237–251.
- Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, Peters CJ, Nichol ST 1997. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* 238: 115–127.
- Johnson AM, Souza LTM, Ferreira IB, Pereira LE, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ, Nichol ST 1999. Genetic Investigation of Novel Hantaviruses Causing Fatal HPS in Brazil. *Journal of Medical Virology* 59: 527–535.
- Jonsson CB, Figueiredo LTM, Vapalahti O 2010. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clinical Microbiology Reviews* 23: 412–441.
- Kallio ER, Begon M, Henttonen H, Koskela E, Mappes T, Vaheri A, Vapalahti O 2010. Hantavirus infections in fluctuating host populations: the role of maternal antibodies. *Proceedings of the Royal Society B Biological sciences* 277: 3783–3791.
- Kallio ER, Poikonen A, Vaheri A, Vapalahti O, Henttonen H, Koskela E, Mappes T 2006. Maternal antibodies postpone hantavirus infection and enhance individual breeding success. *Proceedings of the Royal Society B Biological sciences* 273: 2771–2776.
- Kang HJ, Bennett SN, Sumibcay L, Arai S, Hope AG, Mocz G, Song JW, Cook JA, Yanagihara R 2009. Evolutionary insights from a genetically divergent hantavirus harbored by the European common mole (*Talpa europaea*). *PloS one* 4: e6149.

- Klein SL, Zink MC, Glass GE 2004. Seoul virus infection increases aggressive behaviour in male Norway rats. *Animal Behaviour* 67: 421–429.
- Kruse H, Kirkemo AM, Handeland K 2004. Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerging infectious diseases* 10: 2067–2072.
- Lednicky JA 2003. Hantaviruses: A Short Review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 127: 30–35.
- Leduc JW, Smith GA, Pinheiro FP, Vasconcelos PFC, Rosa EST, Maiztegui JI 1985. Isolation of a Hantaan-related virus from Brazilian rats and serologic evidence of its widespread distribution in South America. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 34: 810–815.
- Lee HW, Lee PW, Johnson KM 1978. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. *The Journal of infectious diseases* 137: 298–308.
- Legendre P, Legendre L 1998. *Numerical Ecology: Developments in Environmental Modelling* 20. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands.
- Lehmer EM, Clay CA, Wilson E, St Jeor S, Dearing MD 2007. Differential resource allocation in deer mice exposed to Sin Nombre Virus. *Physiological and biochemical zoology: PBZ* 80: 514–521.
- Leite PF 2002. Contribuição ao conhecimento fitoecológico do sul do Brasil. *Ciência e Ambiente* 24: 51–74.
- Lima DO, Azambuja BO, Camilotti VL, Cáceres NC 2010. Small mammal community structure and microhabitat use in the austral boundary of the Atlantic Forest, Brazil. *Zoologia (Curitiba)* 27: 99–105.
- Limongi JE 2013. Caracterização genética dos hantavírus em roedores sigmodontíneos e humanos em área endêmica de Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus no Estado de Minas Gerais. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia: 95p.



- Limongi JE, Moreira FG, Peres JB, Suzuki A, Ferreira IB, Souza RP, Pinto RMC, Pereira LE 2013. Serological survey of hantavirus in rodents in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 55: 155–158.
- Linsingen L Von, Sonehara JS, Uhlmann A, Cervi A 2006. Composição florística do Parque Estadual do Cerrado de Jaguariaíva , Paraná , Brasil Composition of the vegetation of the Parque Estadual do Cerrado of Jaguariaíva , Paraná , Brazil. *Acta Biologica Paranaense* 35: 197–232.
- Lira PK, Fernandez FAS, Carlos HSA, Curzio PL 2007. Use of a fragmented landscape by three species of opossum in south-eastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 23: 427.
- Mantel N 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research* 27: 209–220.
- Marques RV, Cademartori CV, Pacheco SM 2011. Mastofauna no Planalto das Araucárias, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 9: 278–288.
- Martin PS, Gheler-Costa C, Lopes PC, Rosalino LM, Verdade LM 2012. Terrestrial non-volant small mammals in agro-silvicultural landscapes of Southeastern Brazil. *Forest Ecology and Management* 282: 185–195.
- Mills JN 2006. Biodiversity loss and emerging infectious disease: An example from the rodent-borne hemorrhagic fevers. *Emerging Infectious Diseases* 7: 9–17.
- Mills JN, Corneli A, Young JC, Garrison LE, Khan AS, Ksiazek TG 2002. Hantavirus pulmonary syndrome-United States: updated recommendations for risk reduction. *MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control* 51: 1–12.
- Mills JN, Ksiazek TG, Ellis BA, Rollin PE, Nichol ST, Yates TL, Gannon WL, Levy CE, Engelthaler DM, Davis T, Tanda DT, Frampton WJ, Nichol CR, Peters CJ, Childs JE 1997. Patterns of association with host and habitat: antibody reactive with Sin Nombre virus in small mammals in the major biotic communities of the southwestern United States. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 56: 273–284.

- Mills JN, Ksiazek TG, Peters CJ, Childs JE 1999. Long-term studies of hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: a synthesis. *Emerging infectious diseases* 5: 135–142.
- Mills JN, Schmidt K, Ellis BA, Calderón G, Enría DA, Ksiazek TG 2007. A longitudinal study of hantavirus infection in three sympatric reservoir species in agroecosystems on the Argentine Pampa. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 7: 229–240.
- Ministério da Saúde 2013. Casos confirmados de Hantavirose: Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1993 a 2013. Brasília/DF, Brasil. Disponível em [http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jun/21/ANEXO\\_HANTA\(2\).pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jun/21/ANEXO_HANTA(2).pdf)
- Monteiro-Filho ELA, Graipel ME, Cáceres NC 2006. História Natural da cuíca-d'água *Chironectes minimus* e da cuíca-marrom *Lutreolina crassicaudata*. In: Cáceres NC, Monteiro-Filho ELA (Eds.), *Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e evolução*, Editora da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS, Brasil, pp. 287–295.
- Naxara L, Pinotti BT, Pardini R 2009. Seasonal Microhabitat Selection by Terrestrial Rodents in an Old-Growth Atlantic Forest. *Journal of Mammalogy* 90: 404–415.
- Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov SP, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs JE, Zaki SR, Peters CJ 1993. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science (New York, N.Y.)* 262: 914–917.
- Olifiers N, Cunha AA, Grelle CEV, Bonvicino CR, Geise L, Pereira LG, Vieira MV, D'Andrea PS, Cerqueira R 2007. Mamíferos não-voadores do Parque Nacional da Serra dos Órgãos. In: Cronemberger C, Viveiros-de-Castro EB (Eds.), *Ciência e conservação na Serra dos Órgãos*, IBAMA, Brasília/DF, Brasil, pp. 183–192.
- Oliveira RC 2012. Análise eco-epidemiológica longitudinal de hantavirus em populações de roedores silvestres e serie histórica da Síndrome Pulmonar por Hantavirus em Santa Catarina, Brasil. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

- Oliveira SV de 2013. Análise preditiva da distribuição geográfica de hantavírus no Brasil. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Universidade de Brasília: 129p.
- Oliveira JA, Bonvicino CR 2011. Ordem Rodentia. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP (Eds.), Mamíferos do Brasil, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR, Brasil, pp. 358–414.
- Oliveira RC, Guterres A, Schrago CG, Fernandes J, Teixeira BR, Zeccer S, Bonvicino CR, D’Andrea PS, Lemos ERS 2012. Detection of the first incidence of *Akodon paranaensis* naturally infected with the Jabora virus strain (Hantavirus) in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107: 424–428.
- Oliveira RC, Padula PJ, Gomes R, Martinez VP, Bellomo C, Bonvicino CR, Freire e Lima DI, Bragagnolo C, Caldas ACS, D’Andrea PS, Lemos ERS de 2011. Genetic characterization of hantaviruses associated with sigmodontine rodents in an endemic area for hantavirus pulmonary syndrome in southern Brazil. *Vector borne and zoonotic diseases* (Larchmont, N.Y.) 11: 301–314.
- Oliveira RC, Teixeira BR, Mello FCA, Pereira AP, Duarte AS, Bonaldo MC, Bonvicino CR, D’Andrea PS, Lemos ERS 2009. Genetic characterization of a Jquitiba-like viral lineage in *Oligoryzomys nigripes* in Rio de Janeiro, Brazil. *Acta tropica* 112: 212–218.
- Olsson GE, Leirs H, Henttonen H 2010. Hantaviruses and Their Hosts in Europe: Reservoirs Here and There , But Not Everywhere? *Vector borne and zoonotic diseases* (Larchmont, N.Y.) 10: 549–561.
- OMS, Organização Mundial da Saúde 2011. Health topics - Zoonoses. Disponível em <http://www.who.int/zoonoses/en/>.
- Orrock JL, Allan BF, Drost CA 2011. Biogeographic and ecological regulation of disease: prevalence of Sin Nombre Virus in Island Mice is related to island area , precipitation, and predator richness. *Sin Nombre* 177: 691–697.
- Ostfeld RS, Keesing F 2012. Effects of Host Diversity on Infectious Disease. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43: 157–182.

- Owen RD, Goodin DG, Koch DE, Chu YK, Jonsson CB 2010. Spatiotemporal variation in *Akodon montensis* (Cricetidae: Sigmodontinae) and hantaviral seroprevalence in a subtropical forest ecosystem. *Journal of Mammalogy* 91: 467–481.
- Padula PJ, Edelstein A, Miguel SD, López NM, Rossi CM, Rabinovich RD 1998. Hantavirus Pulmonary Syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* 241: 323–330.
- Paglia AP, Júnior PDM, Costa FM, Pereira RF, Lessa G 1995. Heterogeneidade estrutural e diversidade de pequenos mamíferos em um fragmento florestal de mata secundária de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Zoologia* 12: 67–79.
- Palma RE, Polop JJ, Owen RD, Mills JN 2012. Ecology of rodent-associated hantaviruses in the Southern Cone of South America: Argentina, Chile, Paraguay, and Uruguay. *Journal of wildlife diseases* 48: 267–281.
- Pardini R, Bueno AA, Gardner TA, Prado PI, Metzger JP 2010. Beyond the fragmentation threshold hypothesis: regime shifts in biodiversity across fragmented landscapes. *PloS one* 5: e13666.
- Pardini R, Souza SM, Braga-Neto R, Metzger JP 2005. The role of forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic forest landscape. *Biological Conservation* 124: 253–266.
- Passamani M, Fernandez FAS 2011. Abundance and richness of small mammals in fragmented Atlantic Forest of southeastern Brazil. *Journal of Natural History* 45: 553–565.
- Passamani M, Ribeiro D 2009. Small mammals in a fragment and adjacent matrix in southeastern Brazil. *Brazilian journal of biology* 69: 305–309.
- Pedó E, Freitas TRO, Hartz SM 2010. The influence of fire and livestock grazing on the assemblage of non-flying small mammals in grassland-Araucaria Forest ecotones, Southern Brazil. *Zoologia (Curitiba, Impresso)* 27: 533–540.
- Peixoto ID, Abramson G 2006. The effect of biodiversity on the Hantavirus epizootic. *Ecology* 87: 873–879.

- Pereira LA, Chagas WA, Costa JE 1993. Ecologia de pequenos mamíferos silvestres da Mata Atlântica, Brasil: I. ciclos reprodutivos de *Akodon cursor*, *Nectomys squamipes* e *Oryzomys nigripes* (Rodentia, Cricetinae). *Revista Brasileira de Zoologia* 10: 389–398.
- Pereira LE, Suzuki A, Bisordi I, Souza RP, Souza LTM, Oshiro FM, Cerroni MP, Neto RSA, Pinho JRR 2007. Estudo longitudinal da prevalência dos vírus Juquitiba e Araraquara em roedores das regiões da Mata Atlântica e do Cerrado do Brasil. *Boletim Epidemiológico Paulista* 4: 2–13.
- Perini AA 2010. A importância da *Araucaria angustifolia* na dieta de pequenos roedores silvestres em área de floresta com Araucária no Sul do Brasil. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia (Diversidade e Manejo de Vida Silvestre). Universidade do Vale do Rio dos Sinos: 41p.
- Pine RH, Handley CO 2008. Genus *Monodelphis* Burnett, 1830. In: Gardner AL (Ed.), *Mammals of South America, Vol. 1: Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*, The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA, pp. 82–107.
- Pires AS, Koeler Lira P, Fernandez FAS, Schittini GM, Oliveira LC 2002. Frequency of movements of small mammals among Atlantic Coastal Forest fragments in Brazil. *Biological Conservation* 108: 229–237.
- Piudo L, Monteverde MJ, Walker RS, Douglass RJ 2011. Rodent community structure and andes virus infection in sylvan and peridomestic habitats in northwestern patagonia, Argentina. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 11: 315–324.
- Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A 1996. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *The Journal of general virology* 77: 2677–2687.
- Prevedello JA, Delciellos AC, Vieira MV 2009. Homing behavior of *Philander frenatus* (Didelphimorphia, Didelphidae) across a fragmented landscape in the Atlantic Forest of Brazil. *Mastozoologia Neotropical* 16: 475–480.
- Püttker T, Martins TK, Bueno ADA, Rossi NF, Pardini R 2012. Perda e Fragmentação do Habitat – um Índice de Vulnerabilidade Baseado em Padrões de Ocupação. In: Cáceres NC (Ed.), *Os Marsupiais do Brasil: Biologia, Ecologia e Conservação*, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS, Brasil, pp. 455–469.

- Püttker T, Meyer-lucht Y, Sommer S 2008a. Fragmentation effects on population density of three rodent species in secondary Atlantic. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 43: 11–18.
- Püttker T, Pardini R, Meyer-Lucht Y, Sommer S 2008b. Responses of five small mammal species to micro-scale variations in vegetation structure in secondary Atlantic Forest remnants, Brazil. *BMC ecology* 8: 9.
- Raboni SM, Probst CM, Bordignon J, Zeferino A, Duarte dos Santos CN 2005. Hantaviruses in Central South America: phylogenetic analysis of the S segment from HPS cases in Paraná, Brazil. *Journal of Medical Virology* 76: 553–562.
- Raboni SM, Borba L, Hoffmann FG, Noronha L, Azevedo MLV, Carstensen S, Mazzarotto GACA, Bordignon J, Duarte dos Santos CN 2009a. Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of Brazil: case report. *Journal of Clinical Virology* 45: 153–156.
- Raboni SM, Hoffmann FG, Oliveira RC, Teixeira BR, Bonvicino CR, Stella V, Carstensen S, D’Andrea PS, Bordignon J, Lemos ERS, Duarte dos Santos CN 2009b. Phylogenetic characterization of hantaviruses from wild rodents and hantavirus pulmonary syndrome cases in the state of Parana (Southern Brazil). *The Journal of General Virology* 90: 2166–2171.
- Raboni SM, Delfraro A, Borba L, Teixeira BR, Stella V, Araujo MR, Carstensen S, Rubio G, Maron A, Lemos ERS, D’Andrea PS, Duarte dos Santos CN 2012. Hantavirus infection prevalence in wild rodents and human anti-hantavirus serological profiles from different geographic areas of South Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87: 371–378.
- Ramsden C, Melo FL, Figueiredo LM, Holmes EC, Zanotto PMA 2008. High rates of molecular evolution in hantaviruses. *Molecular biology and evolution* 25: 1488–1492.
- Reusken C, Heyman P 2013. Factors driving hantavirus emergence in Europe. *Current opinion in virology*: 1–8.
- Ribeiro JF, Vieira EM 2012. Os Mamíferos e a Floresta com Araucária brasileira: riqueza de espécies e relevância para a conservação. In: Freitas TRO, Vieira EM (Eds.), *Mamíferos*

do Brasil: Genética, Sistemática, Ecologia e Conservação - Volume II, Sociedade Brasileira de Mastozoologia, Rio de Janeiro/RJ, Brasil, pp. 164–176.

Rocha CR, Ribeiro R, Takahashi FSC, Marinho-Filho J 2011. Microhabitat use by rodent species in a Central Brazilian Cerrado. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde* 76: 651–653.

Ronquist F, Huelsenbeck JP 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics (Oxford, England)* 19: 1572–1574.

Rosa EST, Medeiros DBA, Nunes MRT, Simith DB, Pereira AS, Elkhoury MR, Lavocat M, Marques AAR, Via AV, D'Andrea PS, Bonvicino CR, Lemos ERS, Vasconcelos PFC 2011. Pygmy rice rat as potential host of Castelo dos Sonhos Hantavirus. *Emerging infectious diseases* 17: 1527–1530.

Rosa EST, Medeiros DBA, Nunes MRT, Simith DB, Pereira ADS, Elkhoury MR, Santos ED, Lavocat M, Marques AA, Via AVG, Kohl VA, Terças ACP, D'Andrea PS, Bonvicino CR 2012. Molecular Epidemiology of Laguna Negra Virus, Mato Grosso State, Brazil. *Emerging infectious diseases* 18: 982–985.

Rosa EST, Mills JN, Padula PJ, Elkhoury MR, Ksiazek TG, Mendes WS, Santos ED, Araújo GCB, Martinez VP, Rosa JFST, Edelstein A, Vasconcelos PFC 2005. Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 5: 11–19.

Rosa AO, Vieira EM 2010. Comparação da diversidade de mamíferos entre áreas de Floresta de Restinga e áreas plantadas com *Pinus elliottii* no Sul do Brasil. In: Pessôa LM, Siciliano S, Tavares WC (Eds.), *Mamíferos das Restingas e Manguezais do Brasil*, Sociedade Brasileira de Mastozoologia - Museu Nacional, Rio de Janeiro/RJ, Brasil, pp. 225–242.

Rossi NF 2011. Pequenos mamíferos não-voadores do Planalto Atlântico de São Paulo: Identificação, história natural e ameaças. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Zoologia. Universidade de São Paulo: 400p.

- Ruedas LA, Bravo JS, Tinnin DS, Armién B, Cáceres L, García A, Díaz MÁ, Gracia F, Suzán G, Peters CJ, Yates TL, Mills JN 2004. Community ecology of small mammal populations in Panamá following an outbreak of Hantavirus pulmonary syndrome. *Journal of Vector Ecology*.
- Ruo SL, Li YL, Tong Z, Ma QR, Liu ZL, Tang YW, Ye KL, McCormick JB, Fisher-Hoch SP, Xu ZY 1994. Retrospective and prospective studies of hemorrhagic fever with renal syndrome in rural China. *The Journal of infectious diseases* 170: 527–534.
- Scheibler DR, Christoff AU 2007. Habitat associations of small mammals in southern Brazil and use of regurgitated pellets of birds of prey for inventoring a local fauna. *Brazilian journal of biology* 67: 619–625.
- Schmidt KA, Ostfeld RS 2001. Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology* 82: 609–619.
- Silva CR da 2001. Riqueza e diversidade de mamíferos não-voadores em um mosaico formado por plantios de *Eucalyptus saligna* e remanescentes de Floresta Atlântica no município de Pilar do Sul, SP. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais. Universidade de São Paulo: 95p.
- Silva MV, Vasconcelos MJ, Hidalgo NTR, Veiga APR, Canzian M, Marotto PCF, Lima VCP 1997. Hantavirus Pulmonary Syndrome: Report of the first three cases in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 39: 231–234.
- Silveira F 2012. Estrutura populacional de pequenos mamíferos na Reserva do Cachoeira, APA de Guaraqueçaba, Paraná. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Zoologia. Universidade Federal do Paraná: 63p.
- Smith MF, Patton JL 1993. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50: 149–177.
- Sobreira M, Souza GT, Moreli ML, Borges AA, Morais FA, Figueiredo LTM, Almeida AMP 2008. A serosurvey for hantavirus infection in wild rodents from the states of Rio de Janeiro and Pernambuco, Brazil. *Acta tropica* 107: 150–152.



- SOSMA, Fundação SOS Mata Atlântica 2012. Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica. Disponível em <http://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica>
- Straube FC 1998. O Cerrado no Paraná: ocorrência original e atual e subsídios para sua conservação. Cadernos de Biodiversidade (Instituto Ambiental do Paraná, Curitiba) 1: 12–24.
- Straube FC, Urben-filho A, Gatto C 2005. A avifauna do Parque Estadual do cerrado (Jaguariaíva, Paraná) e a conservação do Cerrado em seu limite meridional de ocorrência. Atividades Ornitológicas 127: 29–50.
- Suárez O V, Cueto GR, Cavia R, Villafañe IEG, Bilenca DN, Edelstein A, Martínez P, Miguel S, Bellomo C, Hodara K, Padula PJ, Busch M 2003. Prevalence of infection with hantavirus in rodent populations of central Argentina. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98: 727–732.
- Suzán G, Marcé E, Giermakowski JT, Mills JN, Ceballos G, Ostfeld RS, Armién B, Pascale JM, Yates TL 2009. Experimental evidence for reduced rodent diversity causing increased hantavirus prevalence. PloS one 4: e5461.
- Suzuki A, Bisordi I, Levis S, Garcia J, Pereira LE, Souza RP, Sugahara TKN, Pini N, Enria D, Souza LTM 2004. Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil. Emerging infectious diseases 10: 2127–2134.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution 28: 2731–2739.
- Terborgh J, Lopez L, Nuñez P, Rao M, Shahabuddin G, Orihuela G, Riveros M, Ascanio R, Adler GH, Lambert TD, Balbas L 2001. Ecological meltdown in predator-free forest fragments. Science (New York, N.Y.) 294: 1923–1926.
- Tersago K, Schreurs A, Linard C, Verhagen R, Dongen S Van, Leirs H 2008. Population, environmental, and community effects on local bank vole (*Myodes glareolus*) Puumala virus infection in an area with low human incidence. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.) 8: 235–244.

- Tiepolo L 2007. Roedores Sigmodontinae do Brasil Meridional: composição taxonômica, distribuição e relações fitogeográficas. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Zoologia. Museu Nacional - Universidade Federal do Rio de Janeiro: 254p.
- Umetsu F, Naxara L, Pardini R 2006. Evaluating the Efficiency of Pitfall Traps for Sampling Small Mammals in the Neotropics. *Journal of Mammalogy* 87: 757–765.
- Umetsu F, Pardini R 2007. Small mammals in a mosaic of forest remnants and anthropogenic habitats — evaluating matrix quality in an Atlantic forest landscape. *Landscape Ecology* 22: 517–530.
- Vadell M V, Bellomo C, San Martín A, Padula P, Villafañe IG 2011. Hantavirus ecology in rodent populations in three protected areas of Argentina. *Tropical medicine & international health* 16: 1342–1352.
- Vaz VC, D’Andrea PS, Jansen AM 2007. Effects of habitat fragmentation on wild mammal infection by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 134: 1785–1793.
- Vieira EM, Ribeiro JF, Iob G 2011. Seed predation of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) by small rodents in two areas with contrasting seed densities in the Brazilian Araucaria Forest. *Journal of Natural History* 45: 843–854.
- Vilela JF, Russo CAM, Oliveira JA 2010. An assessment of morphometric and molecular variation in *Monodelphis dimidiata* (Wagner, 1847) (Didelphimorphia: Didelphidae). *Biologia* 2646: 26–42.
- Vogel HF, Valle LGE, Zawadzki CH, Metri R 2010. Levantamento preliminar e biologia da mastofauna da RPPN Ninho do Corvo no município de Prudentópolis – Paraná. *SaBios: Revista de Saúde e Biologia* 5: 39–46.
- Voss RS, Lunde DP, Jansa SA 2005. On the contents of *Gracilinanus* Gardner and Creighton, 1989, with the description of a previously unrecognized clade of small didelphid marsupials. *American Museum Novitates* 3482: 1–36.
- Voutilainen L, Savola S, Kallio ER, Laakkonen J, Vaheri A, Vapalahti O, Henttonen H 2012. Environmental change and disease dynamics: effects of intensive forest management on Puumala hantavirus infection in boreal bank vole populations. *PloS one* 7: e39452.

- Woolhouse MEJ, Gowtage-Sequeria S 2005. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerging infectious diseases* 11: 1842–1847.
- Xiao S, Chu Y, Knauert FK, Lofts R, Dalrymple JM, Leduc JW 1992. Comparison of hantavirus isolates using a genus-reactive primer pair polymerase chain reaction. *Journal of General Virology* 73: 567–573.
- Yahnke CJ, Meserve PL, Ksiazek TG, Mills JN 2001. Patterns of infection with Laguna Negra virus in wild populations of *Calomys laucha* in the central Paraguayan Chaco. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 65: 768–776.
- Zeitz PS, Butler JC, Cheek JE, Samuel MC, Childs JE, Shands LA, Turner RE, Voorhees RE, Sarisky J, Rollin PE 1995. A case-control study of Hantavirus Pulmonary Syndrome during an outbreak in the southwestern United States. *The Journal of infectious diseases* 171: 864–870.