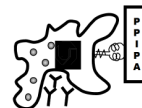




UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia aplicadas

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS HANTAVÍRUS EM ROEDORES
SIGMODONTÍNEOS E HUMANOS EM ÁREA ENDÊMICA DE SÍNDROME
CARDIOPULMONAR POR HANTAVÍRUS NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Jean Ezequiel Limongi

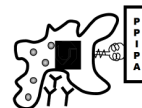
Uberlândia-MG

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS HANTAVÍRUS EM ROEDORES
SIGMODONTÍNEOS E HUMANOS EM ÁREA ENDÊMICA DE SÍNDROME
CARDIOPULMONAR POR HANTAVÍRUS NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor

Aluno: Jean Ezequiel Limongi

Orientador: Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó

Co-orientadora: Prof. Dra. Elba Regina Sampaio Lemos (IOC-FIOCRUZ-RJ)

Uberlândia-MG
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

L734c Limongi, Jean Ezequiel, 1978-
2013 Caracterização genética dos hantavírus em roedores
 sigmodontíneos
 e humanos em área endêmica de síndrome cardiopulmonar
 por hantavírus no estado de Minas Gerais / Jean Ezequiel
 Limongi. – 2013.
 86 f. : il.

Orientador: Matias Pablo Juan Szabó.

Coorientadora: Elba Regina Sampaio Lemos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Hantavírus - Teses. I. Szábo, Matias Pablo
Juan. II. Lemos, Elba Regina Sampaio. III. Universidade Federal de Uber-
lândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Apli-
cadas. IV. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
E-Mail: coipa@ufu.br - Telefax: www.imunoparasito.ufu.br (034)3218-2333
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG



Jean Ezequiel Limongi

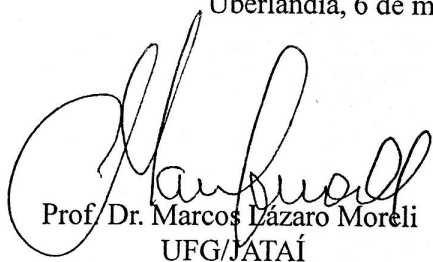
“Caracterização genética dos hantavírus em roedores sigmodontíneos e humanos em área endêmica de Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus no estado de Minas Gerais”

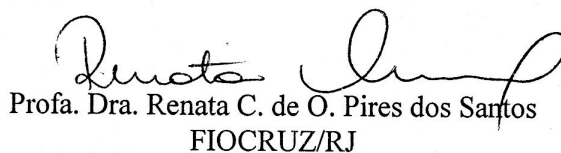
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

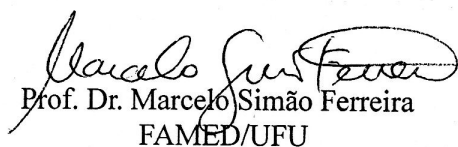
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

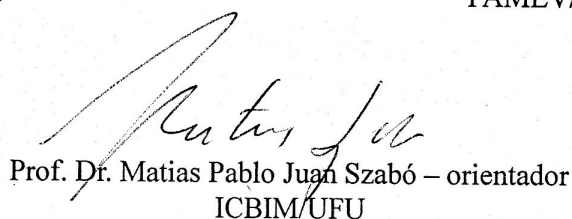
Uberlândia, 6 de maio de 2013.


Prof. Dr. Marcos Lázaro Moreli
UFG/JATAÍ


Profa. Dra. Renata C. de O. Pires dos Santos
FIOCRUZ/RJ


Prof. Dr. Marcelo Simão Ferreira
FAMED/UFU


Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros
FAMEV/UFU


Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó – orientador
ICBIM/UFU

Dedico este trabalho a minha esposa Aline e ao meu filho, João Ricardo, minha felicidade, minha realização pessoal, onde encontro forças para lutar sempre. Somente muito amor e compreensão puderam ajudar a superar tantos momentos que poderíamos estar juntos e que, no entanto não foi possível durante estes anos. Neste período, nos casamos, nasceu nosso filho, tudo que eu sempre quis. Com essa nova conquista, prometo retribuí-los toda a felicidade que vocês me proporcionam.

“E sem saber que era impossível, ele foi lá e fez”.

Jean Cocteau

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda equipe do Centro de Controle de Zoonoses que durante 10 anos de convivência sempre colaborou em minhas pesquisas, em especial neste estudo, no árduo trabalho de campo.

Agradeço ao meu amigo Joel, profissional empenhado e comprometido, que com toda a sua experiência de campo me auxiliou muito nas capturas de roedores. Sem a certeza de sua ajuda, provavelmente não teria tanta confiança em realizar esta jornada.

Agradeço ao Luizinho, Amaral, Darci e o Wellington, que colaboraram tanto nas capturas de roedores, sei que fora as horas-extras, grande parte do esforço de vocês foi por pura amizade, agradeço muito.

Como posso agradecer meu eterno chefe Pajuaba, ou como costumava dizer com muito orgulho “Paijuaba”. Nessa década de convivência sempre precisei muito de você e com certeza minha vida acadêmica sempre precisou do seu apoio, obrigado meu amigo.

Agradeço as minhas amigas da equipe técnica do Centro de Controle de Zoonoses, Márcia, Ana Cláudia, Juliana e Erlândia, nossa equipe é como uma família, cheia de problemas, mas maravilhosa.

Obrigado meu amigo Arruda, sempre que precisei de ajuda nunca hesitei em lhe pedir pois já sabia a resposta, tenho você como exemplo de determinação, trabalho e amizade, conte sempre comigo.

Agradeço ao Alex Guterres, ao Neto, ao João Batista, ao Joaquim (FIOCRUZ) pela colaboração gigantesca no campo. Sem vocês seria inviável este trabalho, vocês sabem disso. Obrigado também Jorlan, por tanto empenho no laboratório com minhas amostras.

Como posso agradecer a minha amiga, quase irmã Renata, desde que nos conhecemos há 10 anos atrás em um trabalho de campo em Santa Catarina, se estabeleceu uma amizade muito grande, saber que eu poderia contar com você foi essencial para realizar este estudo.

Agradeço a Dra Elba Lemos, de forma bem simples, por que não consigo expressar em palavras toda a gratidão, respeito e admiração que tenho por você. A sua função extrapola a de orientação, o exemplo de ética, amizade e competência que é passado para todos aqueles que compartilham a vida acadêmica com você é maravilhoso, vou guardar isso por toda a minha vida.

Agradeço a minha esposa Aline, por ter que aguentar todo o meu estresse estes anos. Sempre disposta a me ajudar, mesmo estando sempre muito ocupada também. Obrigado meu amor!

Agradeço muito a Deus (e a minha esposa) por ter me proporcionado esse presente de ser pai, pai do João Ricardo, esse carrapatinho lindo que eu me orgulho tanto. Você é o amor do pai, faço tudo por você e pela mamãe.

Não tenho palavras para expressar toda a gratidão e respeito que tenho pelo meu sogro Ali e minha sogra Suelene, sempre presentes e solidários em todo o tempo que precisei, em especial durante os últimos dois anos, em que tive de dividir o tempo da pesquisa com o maravilhoso tempo de início do meu casamento e da vinda do nosso anjinho, João Ricardo. A forma com que nos ajudaram a cuidar do nosso filho neste período, com tanta dedicação e carinho, não tem preço. Muito obrigado por tudo.

Obrigado mãe e pai, vocês sempre serão meus heróis, exemplo de garra, determinação, sempre lutando para que todos os filhos pudessem ter uma vida melhor do que vocês tiveram. Este título dedico também a vocês para provar que toda o sofrimento do passado valeu a pena.

LISTA DE ABREVIACÕES

ARAV: vírus Araraquara

ARAV-N: proteína recombinante do nucleocapsídeo do hantavírus Araraquara

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CEUA: Comissão de Ética na Utilização de Animais

DO: densidade ótica

ELISA: Enzyme- Linked Immunosorbent Assay

FHSR: Febre Hemorrágica com Síndrome Renal

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

HEPA: High-efficiency particulate air

HRP: horseradish peroxidase

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

IOC: Insituto Oswaldo Cruz

JUQV: virus Juquitiba

KCL: cloreto de potássio

PCR: Polymerase Chain Reaction

RPM: Rotações por minuto

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SPH: Síndrome Pulmonar por Hantavírus

TMB: tetrametilbenzidina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do hantavírus.

Figura 2. Ciclo de replicação dos hantavírus

Figura 3. Mapa mundial ilustrando a localização de hantavírus conhecidos por grupo de hospedeiros mamíferos

Figura 4. Localização da área de estudo, com detalhe mostrando os municípios.

Figura 5. A. Fazenda do Glória. B. Fazenda Veadinho. C. Chácaras Balsamo. D. Chácaras Eldorado. E. Campo Florido. F. Fazenda Fernanda. G. Instituto Federal

Figura 6. Armadilhas utilizadas para captura dos roedores. (A) Tomahawk (B) Sherman

Figura 7. A. Anestesia. B. Biometria C. Coleta de sangue por punção cardíaca. D. Retirada de órgãos. E. Retirada de medula óssea do fêmur para análise de cariótipo. F. Armazenamento de amostras em nitrogênio líquido.

Figura 8: Medidas de biossegurança utilizadas na captura dos roedores e processamento das amostras no laboratório de campo. A. EPIs utilizados no trabalho de campo. B. Desinfecção do material cirúrgico utilizado na coleta de órgãos com CB- 30 0,5 % (Ouro fino saúde animal LTDA.) C. Desinfecção das armadilhas após término do trabalho de campo com CB- 30 0,05%. D. Coleta de todo descarte em sacos para material biológico para posterior incineração.

Figura 9: Distribuição de frequências dos roedores segundo classe etária e período de captura.

Figura 10. Relações filogenéticas entre hantavírus baseadas em uma análise bayesiana das distâncias genéticas geradas a partir de comparações das sequências de um fragmento de 382-nt do gene da proteína do nucleocapsídeo. As sequências de nucleotídeos foram analisadas por uma análise bayesiana com o programa MrBayes versão 3. 1. 2, usando o modelo General Time Reversible +G de substituição de nucleotídeos. A barra de escala indica uma sequência de divergência de 0,2. O valor numérico nos clados indica as probabilidades posteriores (pp) que suportam as ramificações interiores. Os nomes das ramificações incluem o número de acesso no GenBank e a espécie viral ou cepa analisada.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Locais de captura dos roedores e fitofisionomias do Cerrado associadas.

Tabela 2. Taxa de sucesso de captura, características e soroprevalência para hantavírus em roedores no município de Uberlândia, Minas Gerais, 2011-2012.

Tabela 3. Número absoluto de espécimes de roedores capturados segundo cada ambiente e espécie no município de Uberlândia, Minas Gerais, 2011-2012.

Tabela 4. Amostras de roedores positivas na pesquisa de hantavírus por sorologia e/ou PCR (pulmão).

Tabela 5. Dados epidemiológicos de pacientes de SPH e resultados de sequenciamento viral em área endêmica de Minas Gerais, Brasil, 2011-2012.

Tabela 6 - Sinais e sintomas apresentados por sete pacientes com SPH em área endêmica de Minas Gerais, Brasil, 2011-2012.

SUMÁRIO

a. RESUMO.....	11
b. ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Aspectos gerais.....	13
1.2 Agente etiológico e replicação viral.....	14
1.3 Ecologia de Reservatórios e Epidemiologia da SPH.....	18
1.4 Aspectos Clínicos, Diagnóstico e Tratamento da SPH.....	21
1. 5 Prevenção e controle.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4. 1 Área de estudo dos casos humanos de SPH.....	28
4. 2 Amostras dos pacientes.....	29
4. 3 Área de estudo dos roedores.....	29
4. 4 Amostras de roedores.....	33
4.5 Coleta de amostras dos roedores.....	34
4. 6 Identificação taxonômica e preservação de material zoológico.....	34
4. 7 Preparação dos cariótipos	35
4. 8 Observação à legislação e aos protocolos de biossegurança.....	35
4. 9 Análise sorológica de casos humanos de SPH.....	37
4. 10 Analise sorológica de roedores.....	38
4. 11 Extração de RNA	39
4. 12 Transcrição Reversa e PCR One Step.....	40
4. 13 Semi-Nested PCR (PCR 2):	41

4. 14	Análise dos produtos da reação de amplificação em eletroforese em gel de agarose...	41
4. 15	Purificação e sequenciamento nucleotídico.....	41
4. 16	Análise do sequenciamento	42
4. 17	Análise filogenética	43
4. 18	Análise estatística.....	43
5.	RESULTADOS.....	44
5. 1	Roedores.....	44
5. 1. 1	Abundância e diversidade das espécies de roedores capturados.....	45
5. 1. 2	Identificação das espécies de roedores capturados.....	46
5. 1. 3	Soroprevalência de anticorpos para hantavírus entre os roedores capturados.....	46
5. 1. 4	Detecção de Hantavírus por RT-PCR.....	46
5. 2	Humanos.....	51
6.	DISCUSSÃO.....	56
7.	CONCLUSÕES.....	64
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
9.	ANEXOS.....	78

RESUMO

Os hantavírus estão entre os patógenos zoonóticos mais importantes para o homem, especialmente devido a alta letalidade, daqueles associados à Síndrome Pulmonar por hantavírus (SPH). No Brasil, mais de 1600 casos de SPH foram confirmados desde 1993, com uma taxa de letalidade de 40%. Os genótipos virais associados à SPH em humanos, bem como os presentes nos roedores silvestres foram investigados em uma área endêmica do estado de Minas Gerais neste estudo. Além disso, a soroprevalência para hantavírus, a cariotipagem das espécies de roedores capturadas e a dinâmica populacional destes animais nas fitofisionomias do Cerrado também foram avaliadas em uma abordagem ecoepidemiológica. O ELISA e/ou o RT-PCR foram utilizados para testar amostras de soro de casos humanos suspeitos de SPH e de roedores silvestres e fragmentos de pulmão de roedores. Em nossa casuística, seis pacientes foram avaliados, destes (100%) foram sororreativos no ELISA, e em seis (100%) foi possível amplificar material genético viral e em cinco (83,3%) foi possível o sequenciamento. Em todos foram observados o genótipo viral Araraquara (ARAV), porém com a formação de dois *clusters* bem definidos. A taxa de letalidade dos casos foi de 50%. Em relação aos roedores, 258 espécimes foram capturados. Nove táxons foram identificados a nível específico e sete a nível genérico, todos pertencentes à subfamília Sigmodontinae. *Necromys lasiurus* foi a espécie mais capturada (70,2). Foi observada maior diversidade de roedores na fitofisionomia Mata seca semidecídua (07 táxons a nível específico e quatro a nível genérico), A estação inverno seco esteve relacionada com o maior sucesso de captura ($p < 0,0001$). Houve maior prevalência de prenhez durante a estação chuvosa ($p < 0,0001$). Observou-se uma prevalência de anticorpos IgG contra hantavírus de 1,6%, todos espécimes de *N. lasiurus*. Dentre os quatro roedores sororreativos, em três (75%) foi possível amplificar material genético viral e em dois (50%) foi possível o sequenciamento. Somente o genótipo viral ARAV foi observado. Estes tiveram maior identidade filogenética com o genótipo viral sequenciado de uma amostra humana do município de Uberlândia-MG, local onde também os roedores foram capturados. As amostras identificadas com ARAV analisados no presente estudo foram distribuídas a uma distância de aproximadamente 400 quilômetros. Apesar da distância geográfica, observamos uma alta identidade filogenética entre duas amostras distantes 384 km entre si. As alterações ambientais e demográficas ocorridas nas últimas décadas na área de estudo afetou a ecologia dos roedores silvestres e facilitou a ocorrência de infecções humanas por hantavírus e a emergência da SPH nesta região, principalmente por ARAV transmitido por *N. lasiurus*. A observação neste estudo apenas do genótipo ARAV em espécimes de *N. lasiurus* e humanos, não exclui a possibilidade de cocirculação de outros genótipos virais nesta área, além da possibilidade da existência de outros reservatórios de hantavírus, inclusive não roedores.

Palavras-chave: Hantavírus, vírus Araraquara, *Necromys lasiurus*, Síndrome Pulmonar por Hantavírus.

ABSTRACT

The hantaviruses are among the most important zoonotic pathogens of humans, especially due to high fatality, those associated with Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS). In Brazil, more than 1600 cases of HPS have been confirmed since 1993, with a fatality rate of 40%. The viral genotypes associated with HPS in humans, as well as those present in wild rodents were investigated in an endemic area of the state of Minas Gerais in this study. Furthermore, the seroprevalence for hantaviruses, the karyotyping of rodent species captured and the population dynamics of these animals on the Cerrado vegetation types were also evaluated in an ecoepidemiological approach. The ELISA and / or RT-PCR were used to test sera from human cases of SPH and wild rodents and rodent lung fragments. In our study, six patients were evaluated, of these six (100%) were seroreactive in ELISA in six (100%) was possible to amplify viral genetic material and in five (83.3%) was possible sequencing. Were observed in all the viral genotype Araraquara (ARAV), but with the formation of two well-defined clusters. The case fatality rate was 50%. Regarding rodents, 258 specimens were captured. Nine taxa were identified to species level and seven in genus level, all belonging to the subfamily Sigmodontinae. *Necromys lasiurus* was the most abundant (70.2). We observed a greater diversity of rodents in a fitofisionomy called semi-deciduous dry forest (07 taxa in species level and four in genus level). The winter dry season was associated with the highest capture success ($p < 0.0001$). There was a higher prevalence of pregnancy during the rainy season ($p < 0.0001$). There was a prevalence of IgG antibodies against hantavirus of 1.6%, all specimens of *N. lasiurus*. Among the four seroreactive rodents, three (75%) was possible to amplify viral genetic material and two (50%) was possible sequencing. Only ARAV viral genotype was observed. Samples of rodents had higher phylogenetic identity with the genotype sequenced of the human sample of Uberlândia, Minas Gerais, where the rodents were also captured. Samples identified with ARAV analyzed in this study were distributed at a distance of approximately 400 kilometers. Despite the geographical distance, we observed a high phylogenetic identity between two samples 384 km distant from each other. The environmental and demographic changes that have occurred in recent decades in the study area affected the ecology of wild rodents and facilitated the occurrence of hantavirus infections in humans and the emergence of HPS in this region, mainly ARAV transmitted by *N. lasiurus*. The observation in this study only the genotype ARAV in specimens of *N. lasiurus* and humans, does not exclude the possibility of co-circulation of other viral genotypes in this area, beyond the possibility of the existence of other reservoirs of hantaviruses, including non-rodents.

Key words: Hantavirus, Araraquara virus, *Necromys lasiurus*, Hantavirus Pulmonary Syndrome.

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais

Os hantavírus (família *Bunyaviridae*, gênero *Hantavirus*) têm distribuição global e são responsáveis por duas diferentes formas de doença humana: a Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) primariamente no Velho Mundo e a Síndrome Pulmonar por Hantavírus (SPH) exclusivamente no Novo Mundo.

Duas epidemias no século passado com agentes etiológicos desconhecidos, durante a guerra da Coréia na década de 50 e na região de Four Corners em 1993, levaram à descrição da FHSR e da SPH, respectivamente (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010). O primeiro reservatório de hantavírus identificado foi o roedor *Apodemus agrarius*, em 1978. Este roedor hospeda o vírus Hantaan, primeiro hantavírus identificado (LEE; LEE; JOHNSON, 1978). Atualmente, seis hantavírus estão associados à FHSR: Hantaan, Dobrava-Belgrado, Seoul, Saaremaa, Amur e Puumala vírus. Todos, com exceção de Puumala vírus, estão presentes em roedores da subfamília Murinae. Esse último tem como hospedeiro a espécie *Clethrionomys glareolus*, um roedor da subfamília Arvicolinae. O hantavírus Puumala também é responsável por uma forma mais branda da FHSR, a nefropatia epidêmica, que ocorre na Europa e Ásia (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010).

Em relação à SPH, de 1993 a 2012, foram identificados 15 hantavírus associados com a doença humana (SILVA, 2012). Dentre eles, destacam-se os hantavírus Araraquara e Juquitiba no Brasil, Andes na Argentina e Chile e Sin Nombre nos Estados Unidos. No Brasil, até o presente momento, cinco genótipos virais estão associados a casos de SPH e os estudos eco-epidemiológicos realizados têm possibilitado a caracterização do reservatório ou reservatório em potencial nas regiões de ocorrência de casos. O roedor *Oligoryzomys nigripes*, uma espécie que ocorre no sul do Brasil e ao longo da Mata Atlântica, transmite os hantavírus Juquitiba. *Necromys lasiurus*, reservatório do vírus Araraquara, é um roedor que vive no bioma Cerrado, área que tem sido degradada massivamente nas últimas décadas por causa da agricultura em larga escala. O roedor *Oligoryzomys utiaritensis* foi identificado como potencial reservatório do vírus Castelo dos Sonhos no estado do Mato Grosso. No estado do Maranhão o roedor *Oligoryzomys fomesi* é o reservatório do vírus Anajatuba. Recentemente o roedor *Calomys callidus* foi associado com a transmissão, também no estado do Mato Grosso, do hantavírus Laguna Negra, vírus que também ocorre na Bolívia, Paraguai e Argentina (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010; TRAVASSOS DA ROSA et

al, 2010; TRAVASSOS DA ROSA et al, 2011; TRAVASSOS DA ROSA et al, 2012). Adicionalmente, outros três genótipos foram isolados apenas em roedores e até o momento não estão associados com a SPH como os hantavírus Rio Mearim, Jaborá e uma linhagem relacionada ao vírus Seoul, identificados em roedores das espécies *Holochilus sciureus*, *Akodon montensis* e *Rattus norvegicus*, respectivamente (LEDUC et al., 1985; ROSA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011).

1.2 Agente etiológico e replicação viral

Em geral, os hantavírus são comumente referidos como hantavírus do Velho Mundo e do Novo Mundo, devido à distribuição geográfica de seus roedores reservatórios e o tipo de doença (FHSR e SPH) que manifestam em humanos (SCHMALJOHN, 1996). A distribuição geográfica e epidemiologia de doenças em geral são associadas aos hantavírus é consequência da distribuição e história natural de seus reservatórios. Apesar das diferenças na localização geográfica e tipo de doença, os hantavírus do Velho e Novo Mundo compartilham alta homologia na organização de suas sequências nucleicas e exibem aspectos similares em seus ciclos de vida (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010).

Os vírus da família *Bunyaviridae* são vírus RNA de fita simples, trissegmentada, circular e com polaridade negativa. São envelopados, apresentando projeções glicoproteicas na superfície do envelope, esféricos e com diâmetro variando de 80 a 120 nm (Figura 1). O core consiste de três ribonucleocapsídeos denominados: grande (L), codificador de uma RNA polimerase RNA dependente (RdRp) também chamada de proteína polimerase L; médio (M), que codifica duas glicoproteínas do envelope (Gn e Gc); pequeno (S) codificador da proteína do ribonucleocapsídeo (N). Cada um dos três ribonucleocapsídeos é constituído por um complexo composto pela proteína do ribonucleocapsídeo (N), a polimerase viral RdRp e um segmento de RNA genômico viral (L, M ou S), que aparentam serem helicoidais. Os três segmentos do RNA viral apresentam tamanho variado entre os diferentes gêneros da família *Bunyaviridae* e mesma complementaridade nucleotídica em suas sequências terminais 3' e 5'. Estas sequências são altamente conservadas entre vírus do mesmo gênero diferindo entre vírus de gêneros diferentes. As sequências nucleotídicas terminais comuns ligam-se de forma estável, não covalente e com pareamento de bases, o que permite aos segmentos apresentarem-se em forma circular. As extremidades dos segmentos de RNA atuam como sítios de reconhecimento para a RdRp. O envoltório lipídico dos hantavírus é derivado do

Complexo de Golgi da célula hospedeira e contém as glicoproteínas virais Gn e Gc (JONSSON et al., 2005; MERTZ, 2002; SCHMALJOHN; HOOPER, 2001).

A interação vírus - célula envolve, inicialmente, a fixação das proteínas virais Gn e Gc aos receptores de superfície das células hospedeiras (SCHMALJOHN; HOOPER, 2001). Hantavírus infectam células endoteliais, epiteliais, macrófago, células dendríticas e linfócitos (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010).

As $\beta 3$ integrinas, proteínas de superfície celular, são consideradas os receptores específicos para a entrada dos hantavírus patogênicos nas células (GAVRILOVSKAYA et al., 1998). Entretanto, estes podem não ser os únicos receptores, uma vez que células sem $\beta 3$ integrinas permitem a infecção (SONG et al, 2005; MOU et al, 2006). Os vírus invadem a célula, provavelmente por endocitose, realizam fusão de seus envelopes às membranas endossômicas e os três ribonucleocapsídeos virais atingem o citoplasma. O genoma viral permanece como ribonucleoproteína, sem desnudamento total do capsídeo que se apresenta em formato circular, associado a numerosas cópias da proteína N e poucas cópias da polimerase viral RdRp (proteína L) (MERTZ, 2002). A transcrição e a replicação são mediadas pela RdRp no citoplasma. Inicialmente ocorre a transcrição primária de RNA mensageiro a partir do RNA genômico. Em determinado momento, a polimerase viral muda sua função de transcrição primária de RNAm para a replicação do genoma da progênie. O ponto chave para a replicação do genoma é a produção de RNA complementar (+) a partir do RNA viral (-). O RNAc serve como um molde para a formação do RNA viral (MERTZ, 2002; SCHMALJOHN; HOOPER, 2001). As glicoproteínas Gn e Gc são traduzidas e processadas no retículo endoplasmático rugoso e no complexo de Golgi, enquanto que a proteína N e a RdRp são traduzidas em ribossomos livres (JONSSON et al., 2005; SCHMALJOHN; HOOPER, 2001). Os segmentos genômicos L, M e S, juntamente com as proteínas traduzidas no citoplasma, são conduzidos ao complexo de Golgi onde acontece a montagem da partícula viral após acúmulo das glicoproteínas Gn e Gc. As partículas virais brotam em vesículas do complexo de Golgi e, finalmente, a progênie viral é liberada por exocitose com fusão das membranas das vesículas citoplasmáticas à membrana celular (MERTZ, 2002). Embora a maioria dos membros da família *Bunyaviridae* estudados sofram maturação no complexo de Golgi, o que os distingue de outros vírus RNA de polaridade negativa, outras formas de maturação também têm sido relatadas. Estudos demonstraram que nos hantavírus *Sin Nombre* e *Black Creek Canal*, as partículas virais brotam preferencialmente da membrana

citoplasmática das células infectadas (Figura 2) (JONSSON et al., 2005; SCHMALJOHN; HOOPER, 2001).

Inclusões são encontradas no citoplasma de células infectadas por diferentes vírus da família *Bunyaviridae* e têm sido consideradas marcadoras ultra-estruturais de células infectadas por hantavírus (SCHMALJOHN; HOOPER, 2001). Estas inclusões são estruturas compostas por componentes virais em excesso sintetizados por células com replicação ativa do vírus (ZAKI et al., 1995).

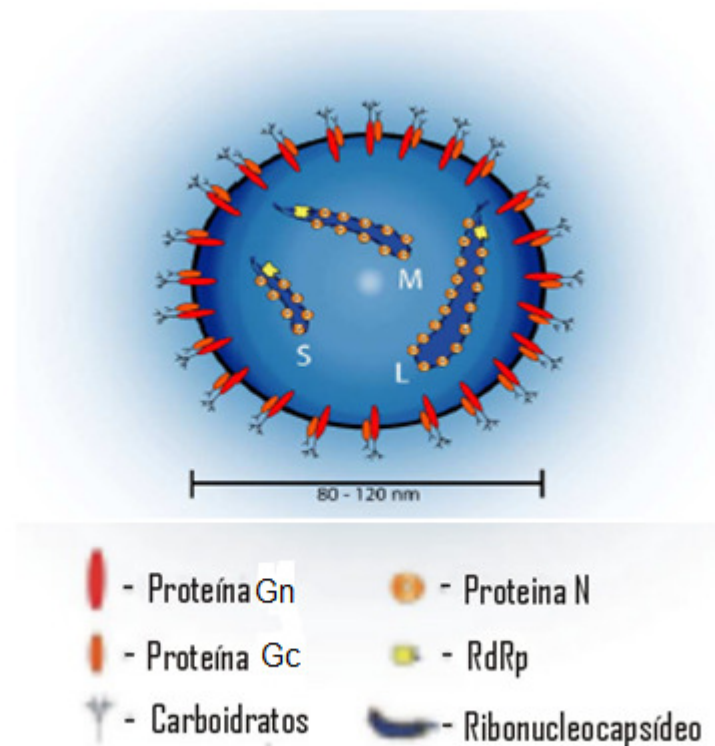
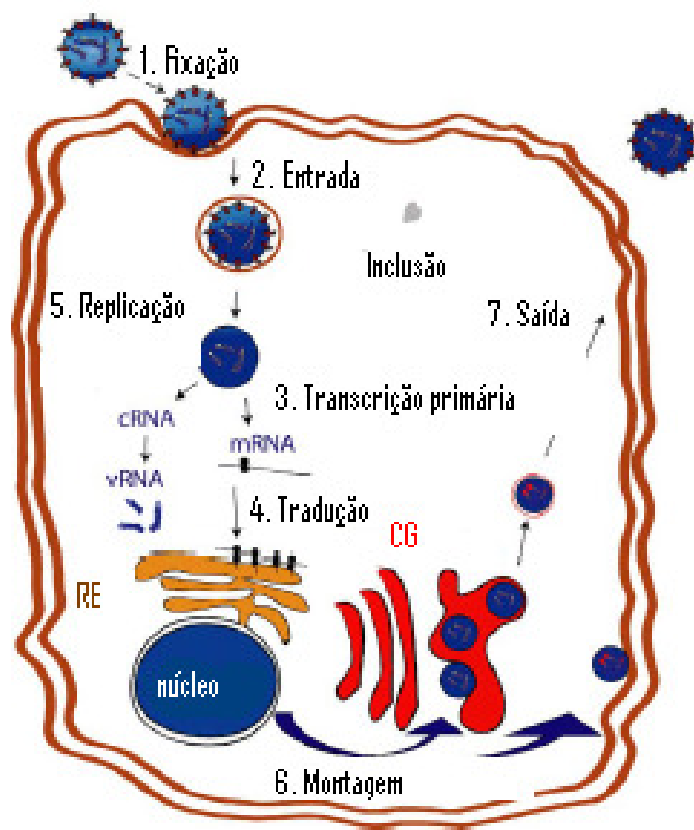


Figura 1. Estrutura do hantavírus.
Fonte: adaptado de JONSSON et al. (2005).



(1) acoplamento do vírus na superfície da célula através de interações entre os receptores do hospedeiro na superfície celular e da glicoproteína viral; (2) entrada por endocitose mediada pelos receptores, englobamento do vírus e a desencapsulamento e liberação do genoma viral; (3) transcrição de RNA complementar (cRNA) a partir do RNA viral (vRNA), utilizando primers derivados do genoma do hospedeiro; (4) tradução do mRNAs L, M e S em proteínas virais usando o maquinário do hospedeiro; (5) replicação e ampliação do vRNA, montagem com a proteína N, e transporte para o aparelho de Golgi; (6) montagem de todos os componentes no aparelho de Golgi ou, possivelmente para vírus do Novo Mundo, na membrana plasmática (montagem alternativa); (7) liberação do vírus por exocitose

Figura 2: Ciclo de vida dos Hantavírus. RE, retículo endoplasmático rugoso; CG, Complexo de Golgi.
Fonte: Jonsson et al. (2005).

1.3 Ecologia de Reservatórios e Epidemiologia da SPH

A SPH é uma zoonose potencialmente fatal e os hantavírus são transmitidos principalmente por roedores da família Cricetidae, mas especificamente das subfamílias *Sigmodontinae* e *Neotominae* (MUSSER; CARLETON, 2005; NICHOL et al., 2005). Cada hantavírus geralmente associa-se a uma espécie de roedor, hospedeiro em que estabelece uma infecção persistente e assintomática, com transmissão do vírus por meio de saliva, fezes e principalmente urina (KUENZI et al., 2005). Um estudo com o roedor *Peromyscus maniculatus*, porém, demonstrou que machos infectados na fase jovem ganham menos peso na fase adulta, o que poderia ocasionar um efeito deletério para estes animais. Entretanto, a infecção por hantavírus, de forma geral, não causa grandes impactos no organismo do roedor (CHILDS et al., 1989; DOUGLAS et al., 2007).

A transmissão entre os roedores pode ocorrer diretamente durante interações agressivas (acasalamento, brigas por território) entre eles ou indiretamente por meio de inalação de aerossóis de urina e fezes contaminadas (PLYUSNIN; MORZUNOV, 2001). Ao contrário de outros vírus da família *Bunyaviridae*, os hantavírus não possuem transmissão por vetores. A presença de cicatrizes nos roedores, principalmente nas orelhas e cauda, já foi associado com soropositividade para hantavírus e estudos em roedores reservatórios demonstram que a prevalência da infecção é maior em adultos machos do que em fêmeas e jovens. O efeito da idade, representado pela longa exposição ao vírus, aumenta a possibilidade de se infectar, sugerindo que a transmissão horizontal é o principal mecanismo de manutenção do vírus na natureza (ABBOTT; KSIAZEK; MILLS, 1999, CALISHER et al, 2007; CANTONI et al., 2001; MADHAV et al, 2007; LIMONGI et al., 2013, PEARCE-DUVET et al, 2006).

A diversidade de hospedeiros, porém, pode ser muito mais abrangente do que a previamente suposta. Um primeiro estudo no início dos anos 90 do século passado já apontava morcegos como reservatórios de hantavírus na Coreia (KIM; LEE; PARK, 1994). A identificação genômica dos hantavírus isolados dos pulmões desses morcegos foi idêntica ao vírus Hantaan (JUNG & KIM, 1995). Porém, só recentemente pesquisas voltadas a outros reservatórios que não roedores têm sido realizadas com o encontro de hantavírus em insetívoros das famílias Soricidae e Talpidae e também em morcegos das famílias Vespertilionidae e Nycteridae, porém ainda sem associação com doença humana (Figura 3) (KANG et al., 2011, SUMIBCAY et al. 2012, WEISS et al., 2012). Além disso, existem hipóteses que sugerem que os hantavírus surgiram primeiramente nestes animais, antes mesmos de emergirem em roedores (GUO et al., 2013).

Em um único estudo preliminar no Brasil, foram encontrados hantavírus em morcegos e também em marsupiais, em uma área com a presença de roedores reservatórios. Em ambos os animais o sequenciamento do segmento S do hantavírus demonstrou 95% de identidade com o hantavírus Araraquara (ARAUJO et al., 2012).

A descoberta desses novos possíveis reservatórios torna a vigilância da doença mais complexa e contesta a visão convencional de que os roedores são os principais hospedeiros reservatórios. Além disso, a história evolutiva dos hantavírus começa a ser questionada, principalmente em relação à hipótese de codivergência/co-evolução com os roedores (KANG et al., 2011, RAMSDEN; HOLMES; CHARLESTON, 2009). Existem inconsistências substanciais entre a biologia dos hantavírus e a história de codivergência com roedores. Por exemplo, alguns hantavírus são capazes de infectar múltiplas espécies de roedores, como o Andes vírus, Dobrava-Belgrado vírus, Puumala vírus e Tula vírus (GONZALEZ et al., 2002; SIBOLD et al., 2001; DEKONENKO et al., 2003; PLYUSNIN et al., 1994). Além disso, a transmissão entre espécies de roedores, a variedade de hantavírus isolados de insetívoros, que são mais relacionados à Ordem Carnivora do que com roedores, e a presença de hantavírus em quirópteros e marsupais, enfraquecem sobremaneira a hipótese de codivergência (ARAI et al., 2007; ARAI et al., 2008; BOHLMAN et al., 2002; MORZUNOV et al., 1998).

A alta biodiversidade de espécies de roedores Sigmodontinae no Brasil, com 71 gêneros e 235 espécies, também representa um potencial enorme de reservatórios e genótipos virais a serem conhecidos, não só de hantavírus, mas também de outras viroses emergentes ou mesmo desconhecidas (OLIVEIRA; BONVICINO, 2006).

Os casos humanos de infecção por hantavírus, porém, até o momento, são quase exclusivamente resultado da interação com roedores, principalmente por meio da inalação de aerossóis de urina e fezes contaminadas (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010). A infecção por mordedura de roedor, com transmissão pela saliva, já foi relatada. Este modo de transmissão, porém, é extremamente raro (MERINO et al., 2002). A transmissão inter-humana associada com o hantavírus Andes foi descrita na região de Bariloche em 1996 e teria acontecido por contato direto, inalação de aerossóis ou fômites contaminados (PADULA et al., 1998; WELLS et al., 1997). Apesar de a transmissão interpessoal ter sido descrita apenas para esse sorotipo viral, esta situação sugeriu revisão nas medidas de precaução e biossegurança no manuseio de pacientes, bem como de espécimes biológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A epidemiologia da infecção por hantavírus é baseada basicamente na transmissão ocorrendo em ambientes fechados, peridomésticos, em áreas rurais. Na região de Uberlândia-MG, no entanto, a transmissão periurbana é relativamente frequente e atinge indivíduos de diferentes ocupações, ao contrário do que é relatado em outras regiões, onde a doença é essencialmente relacionada ao trabalho (LIMONGI et al., 2007a; LAVOCAT et al., 2011).

Existe um padrão de sazonalidade da SPH coincidente com o aumento populacional ou modificação comportamental de roedores portadores do vírus. Na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, por exemplo, a maioria dos casos de SPH ocorre entre os meses de maio e junho. A maior ocorrência nesta época está associada à colheita de grãos, o clima seco e a falta de alimento e água para os roedores no ambiente silvestre, estreitando o contato homem-roedor (LIMONGI et al., 2007a). Curiosamente, nesta região, a maior soroprevalência de anticorpos anti-hantavírus em roedores não é observada nesta época, mas sim no verão. A baixa soroprevalência observada no inverno pode ser causada pela minoria de adultos na população, os quais geralmente apresentam alta prevalência para hantavírus. Inversamente, no verão a população é composta principalmente por indivíduos adultos, o que contribui para a maior prevalência. Na Argentina, também foi observado uma população com maior densidade de adultos de *Akodon azarae* contribuindo para aumentar a soroprevalência da amostra (LIMONGI et al., 2013; SUAREZ et al., 2003). A falta de correlação entre os fatores prevalência de hantavírus em roedores e doença humana, pelo menos na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, pode ser explicada pelo fato que no período em que a prevalência em roedores é alta, o contato homem-roedor não é tão evidente. A abundância de alimento no campo no período de chuvas (verão) não obriga os roedores a invadir ambientes antrópicos. Assim, a circulação do vírus de forma enzoótica nas populações de roedores não afeta diretamente o homem, que é um hospedeiro acidental do vírus. No Estado do Paraná, a sazonalidade observada entre os meses de setembro e março é diferente da observada em outras regiões. A maioria dos casos de SPH está relacionada com a invasão do homem em habitats de roedores, principalmente devido a atividades de desmatamento de florestas de *Pinnus*, que ocorrem no sudeste do estado (RABONI et al., 2005). Na América do Norte, entretanto, atribui-se a sazonalidade dos casos entre a primavera e o verão devido, principalmente, a fenômenos meteorológicos que levam ao excesso de chuvas, vegetação exuberante e proliferação exacerbada de roedores (ENGELTHALER et al., 1999).

Em geral, observa-se uma letalidade mais elevada entre as mulheres. Em um estudo onde se avaliou a série histórica de casos de hantavirose no Brasil no período de 1993 a 2002,

a taxa de letalidade específica por sexo foi mais elevada entre as mulheres, chegando a 62% (SANTOS; GARRETT, 2005). Em outro estudo descritivo do total de casos no Brasil no ano de 2004, a letalidade também foi maior entre as mulheres (41,3%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Em uma casuística de 23 casos ocorridos em Minas Gerais entre 1998 e 2005 foi encontrado um menor número de casos entre as mulheres, porém também com maior letalidade (50%) (LIMONGI et al., 2007a). A ocorrência menos frequente da hantavirose em mulheres pode diminuir a probabilidade de suspeita clínica da doença, favorecendo o agravamento do quadro clínico das pacientes durante o diagnóstico diferencial. Fatores genéticos predisponentes também poderiam estar associados. Entretanto, são necessários estudos que possam comprovar esta hipótese.

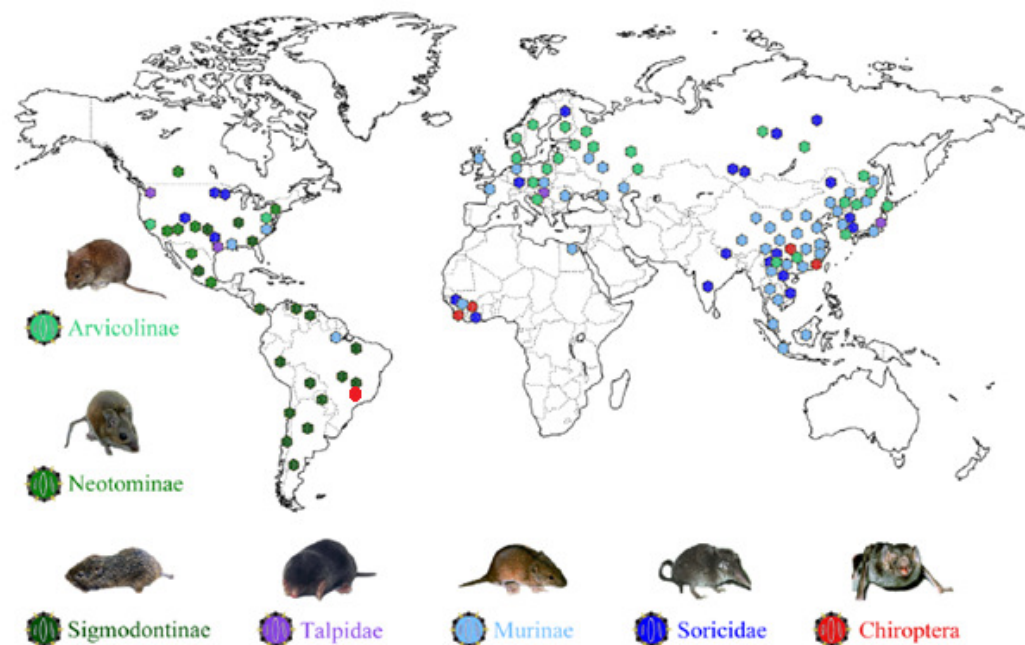


Figura 3: Mapa mundial ilustrando a localização de hantavírus conhecidos por grupo de hospedeiros mamíferos
Fonte: Adaptada de Guo et al, 2013.

1.4 Aspectos Clínicos, Diagnóstico e Tratamento da SPH

O período de incubação da SPH tem em média 14 dias, podendo variar de 2 a 42 dias (YOUNG et al., 2000; SANTOS; GARRETT, 2005). A infecção pode se apresentar desde uma forma assintomática a quadros clínicos clássicos de alta letalidade. Os motivos desse espectro clínico pode estar associado ao genótipo viral envolvido, carga viral inalada na transmissão e também à fatores intrínsecos do paciente (LIMONGI et al., 2007a; LIMONGI

et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2009). A SPH caracteriza-se basicamente por duas fases: 1^a- Febril/Prodrômica, na qual se observam febre, tosse seca, mialgias, astenia e cefaleia intensa, com duração de 3-5 dias; 2^a- Cardiopulmonar, caracterizada por insuficiência respiratória aguda grave e choque circulatório, fase com alta taxa de letalidade; (BRASIL, 2010). Alguns autores ainda relatam uma fase diurética nos pacientes que sobrevivem, na qual há reabsorção do líquido, previamente retido no interstício, seguida, posteriormente, pela fase de convalescença (LEMOS & SILVA, 2005).

O tempo de internação, em média de quatro dias, revela a característica básica da SPH de ser uma doença aguda e de rápida evolução. Em uma análise hematológica de nove casos de SPH internados em terapia intensiva foi possível descrever a evolução do quadro durante o período de internação e notou-se que em três dias de cuidados intensivos houve melhora significativa dos parâmetros hemoconcentração, plaquetopenia e leucocitose com desvio à esquerda (LIMONGI et al., 2007a).

A infecção por hantavírus desencadeia resposta imune celular e humoral intensa, ocasionando fenômenos imunopatogênicos no endotélio vascular, principalmente em localização pulmonar. Os hantavírus causam grandes alterações nas células endoteliais infectadas, sem, no entanto ocorrer lise. Alguns pesquisadores consideram o endotélio como o principal alvo a ser estudado em doenças virais com comprometimento vascular devido à sua capacidade de regular a função plaquetária, ativação de complemento e resposta imune. Métodos terapêuticos com objetivo de estabilizar o endotélio reduziram sensivelmente a gravidade de hemorragias virais e doenças edematosas (GAVRILOVSKAYA et al., 2012).

Amostras de tecido pulmonar obtidas de necropsia de pacientes falecidos por SPH contêm grande número de imunoblastos T CD4+, T CD8+ e células produtoras de citocinas (ZAKI et al., 1995). Várias citocinas detectadas no soro e nos tecidos pulmonares, incluindo TNF- α , IL-2, IL-6 e IFN- γ , são produzidas por células T contribuem para o extravasamento plasmático a partir dos capilares pulmonares (SCHMALJOHN; HOOPER, 2001).

A análise de exames complementares auxilia sobremaneira na suspeita clínica da SPH. Geralmente a tríade leucocitose com desvio à esquerda, trombocitopenia e hemoconcentração estão presentes nos pacientes com a doença. Além disso, infiltrados uni ou bilateral são geralmente identificadas nas radiografias de tórax e alterações nas enzimas hepáticas e no coagulograma também são observadas. A hemoconcentração resulta do grande fluxo de fluidos intravasculares ao parênquima pulmonar, e alguns pacientes podem apresentar hematócrito superior a 60% (FERREIRA, 2003). As elevações dos níveis de aminotransferases

e de DHL são achados comuns em casos de SPH, principalmente na fase cardiopulmonar da doença e refletem o envolvimento hepático causado por esse vírus (FERREIRA, 2003). LIMONGI e colaboradores (2007a) demonstraram também em uma casuística de 23 pacientes que os níveis de gama-glutamil transpeptidase (GGT), que normalmente se apresentam normais na maioria dos casos relatados, estavam elevados em 71% dos casos. A ocorrência de hipoalbuminemia que é comum na fase cardiopulmonar da SPH é resultante do grande afluxo proteico do sangue para os alvéolos pulmonares na fase de edema, além de consumo em decorrência do catabolismo excessivo (FERREIRA, 2003). Estes achados, associados ao perfil epidemiológico do paciente, são essenciais no diagnóstico clínico presuntivo da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; LIMONGI et al., 2007a; VERITY et al., 2000).

Em geral, no início dos sintomas, os pacientes na fase aguda da SPH já apresentam imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) contra a nucleoproteína viral. O diagnóstico sorológico específico de SPH no Brasil consiste na detecção destes anticorpos nos soros suspeitos. A maioria dos antígenos de hantavírus atualmente utilizados em testes sorológicos são aqueles derivados de métodos de DNA recombinante, a nucleoproteína viral, que é a proteína mais conservada e altamente imunogênica dos hantavírus, e também as glicoproteínas Gn e Gc. O teste sorológico de escolha é o imunoenzimático (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay – ELISA). (PADULA et al., 2000). Os anticorpos de classe IgM aparecem durante os primeiros dias de doença e podem ser detectados até 60 dias após o início dos sintomas. Quando não é possível definir o diagnóstico sorológico, em amostra única, uma segunda amostra deve ser coletada com intervalo de tempo de duas a três semanas após a primeira coleta. A reatividade do teste é dada quando há detecção de anticorpos IgM em amostra única ou quando, em duas amostras ocorre soroconversão, ou seja, na segunda amostra de soro são detectados anticorpos de classe IgG com diferença de títulos igual ou maior do que quatro vezes os títulos obtidos na primeira (FERREIRA, 2003). Recentemente no Brasil foi obtida, a partir de células de *Escherichia coli*, a proteína N recombinante do vírus Araraquara. No teste ELISA IgM para hantavírus utilizando esta proteína, foi obtida 97,2% de sensibilidade e 100% de especificidade (FIGUEIREDO et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009).

O genoma de hantavírus pode ser detectado rapidamente por Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR, podendo ser utilizada a partir de diversas amostras clínicas como plasma, soro, coágulo, tecidos e em células monomorfonucleares desde o primeiro dia após os sintomas (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010; AHN et al.,

2000). Existem relatos de detecção do genoma viral mesmo antes do aparecimento dos sintomas, comprovando que o período pré-patente da SPH pode ser menor que o período de incubação (FERRES et al., 2007; PADULA et al., 2007). Em biologia molecular, também se utiliza como alvo os genes da nucleoproteína e/ou glicoproteínas. Dependendo da fase da infecção no momento da coleta da amostra biológica, geralmente os níveis de RNA viral presentes nas amostras humanas e de roedores são baixos e, assim, o sucesso dessa técnica depende da escolha dos iniciadores otimizados para os hantavírus, além da utilização da nested-PCR, para promover maior eficiência na sensibilidade da técnica (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010).

O tratamento dos pacientes com formas leves da SPH é sintomático. A hidratação, quando necessária, deve ser cuidadosa para evitar sobrecarga de volume. Além disso, deve haver controle dos dados vitais dos parâmetros hemodinâmicos e ventilatórios para evitar um desencadeamento do quadro cardio-respiratório. Porém, na maioria das vezes, o paciente procura ou consegue assistência médica só na fase cardiopulmonar da SPH, onde geralmente é necessária terapia intensiva, com cuidadosa infusão endovenosa de líquidos, que, se excessiva, poderá precipitar o edema pulmonar. O manejo adequado do aporte líquido é o principal elemento terapêutico. Em uma casuística de 14 pacientes, CAMPOS e colaboradores (2002) demonstraram que a infusão de líquidos endovenosos em quantidade igual ou superior a 2,5 litros, nas primeiras 24h de internação, esteve associada à maior evolução para óbito em pacientes de SPH. Além disso, o uso de ventilação mecânica, corticoesteróides e aminovasoativas também têm auxiliado no bom prognóstico dos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). No entanto, um estudo mostrou que dentre aqueles pacientes em estado grave que foram submetidos à ventilação invasiva, grande parte evoluiu para o óbito, demonstrando que a instituição desta medida, tardiamente, não influi significativamente no prognóstico de pacientes gravemente comprometidos (LIMONGI et al., 2007a). A antibioticoterapia de espectro adequado é instituída precocemente, uma vez que outras infecções pulmonares graves, por germes comunitários, podem ser a causa da pneumonia e o diagnóstico laboratorial específico da SPH geralmente não é liberado, em tempo hábil, para orientar a terapêutica. Até o momento não existe terapêutica antiviral comprovadamente eficaz contra a SPH. A droga ribavirina tem sido testada com o vírus Andes, e embora seja altamente efetiva na prevenção da replicação e supressão da ativação de mediadores de inflamação, sua eficácia terapêutica é limitada devido à incapacidade de inibir completamente as citocinas associadas à infecção por hantavírus (KHAIBOULLINA et al., 2013).

1. 5 Prevenção e controle

A prevenção da SPH é baseada no controle de roedores e pode ser resumida na eliminação/redução do acesso, água e alimento para estes animais. A maioria dos casos de SPH se infecta em ambientes fechados com presença de aerossóis de urina, saliva e fezes contaminadas com o vírus (SANTOS & GARRETT, 2005). Em geral, paióis, casas de fazenda e outros anexos em áreas rurais ou periurbanas são os principais locais de infecção. Em um estudo realizado na zona rural do município de Uberlândia-MG, mostrou-se que em 100% das propriedades rurais visitadas (n=200) havia fatores de risco para a transmissão do vírus como proximidade da casa ou anexo com a mata (menos de 30 metros), presença de grãos ao nível do solo nos paióis e falta de vedação nas habitações humanas e anexos que impedissem o acesso de roedores (LIMONGI, 2007b). Um maior conhecimento da epidemiologia da SPH e o desenvolvimento de medidas preventivas efetivas dependem de uma compreensão detalhada da ecologia e epizootia dos hospedeiros reservatórios dos hantavírus.

2. Justificativa

No Brasil, mais de 1600 casos de SPH foram confirmados desde 1993, com uma taxa de letalidade de 40%. O estado de Minas Gerais tem o maior número de casos registrados (277), com destaque especial para a região de Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba e sudoeste mineiro (LIMONGI et al., 2007a; OLIVEIRA, comunicação pessoal, 2013). No entanto, somente três estudos moleculares incluíram amostras humanas de casos de SPH desta região, analisando por filogenia apenas 12 amostras, oriundas dos municípios de Araxá, Patrocínio, Uberlândia, Uberaba e Patos de Minas. Neles se associou os casos de SPH principalmente ao vírus Araraquara (ARAV), possivelmente o mais virulento dos hantavírus brasileiros (SUZUKI et al., 2004, FIGUEIREDO et al., 2009).

O roedor *Necromys lasiurus*, que ocorre em áreas de Cerrado e Mata Atlântica, foi implicado como o reservatório deste vírus. Porém evidências da circulação do hantavírus Juquitiba (JUQV), assim como de uma linhagem altamente divergente de ARAV e JUQV foram relatadas em humanos e roedores (ARAÚJO, 2010; FIGUEIREDO et al., 2009; SUZUKI et al., 2004).

Infecções assintomáticas em humanos foram recentemente relatadas por nós nesta área (LIMONGI et al., 2009). Além disso, em outro estudo eco-epidemiológico, o roedor *N. lasiurus* foi o que apresentou maior soroprevalência de infecção, porém soropositividade também foi observada em roedores das espécies *Calomys callosus* e *Calomys tener* (LIMONGI et al., 2013). Porém, em todos esses estudos os roedores foram identificados apenas por caracteres morfológicos, o que compromete sobremaneira a confiabilidade da classificação destes animais, devido à grande semelhança morfológica de algumas espécies. Assim, devido à magnitude da SPH nesta região do estado de Minas Gerais, associado com a escassa literatura específica da doença neste território, procuramos conhecer a história natural da SPH nesta área de forma mais detalhada, em um contexto da vigilância eco-epidemiológica, com enfoque nos roedores reservatórios, casos humanos e genótipos virais.

3. Objetivos:

Objetivo geral:

Estudar a infecção por hantavírus em humanos e roedores e identificar os genótipos virais associados a esses hospedeiros.

Objetivos específicos:

- verificar a prevalência de anticorpos anti-hantavírus em roedores silvestres no município de Uberlândia-MG;
- Verificar a presença de hantavírus em roedores (pulmão, coração, rim, baço e sangue) por meio da realização de RT-PCR;
- Caracterizar com base em características fitofisiográficas as áreas de captura dos roedores;
- Comparar as fitofisionomias em relação à riqueza de espécies;
- Realizar vigilância de casos suspeitos da SPH no Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba e sudoeste mineiro com coleta de amostras para realização de sorologia e biologia molecular;
- Caracterizar as sequências nucleotídicas dos hantavírus de amostras de humanos e de roedores e comparar com as depositadas no GenBank

4. Material e Métodos

4.1 Área de estudo dos casos humanos de SPH

O estudo foi realizado na mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, área com maior incidência de casos de SPH no estado de Minas Gerais. As principais atividades econômicas desenvolvidas no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba são de agricultura e pecuária, produção e processamento de grãos. Esta região está inserida no bioma “Cerrado” caracterizado por pequenas árvores, vegetação baixa e adaptada a longos períodos de seca, mas que está em níveis variáveis de degradação. Adicionalmente uma amostra procedente do município de São Tomás de Aquino, região sudoeste do estado, também foi incluída no estudo (Figura 4).



Figura 4. Localização da área de estudo, com detalhe mostrando os municípios.

4. 2 Amostras dos pacientes

Durante o período de julho de 2011 a dezembro de 2012 foram coletados sangue total ou soro de casos suspeitos de SPH em hospitais do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. O critério de inclusão era a presença de sinais e sintomas de infecção e histórico epidemiológico de contato com áreas de risco para hantavírus. As amostras eram colhidas logo após os sintomas e eram imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) e posteriormente estocadas em ultrafreezer (-70°C). Todas as amostras foram enviadas para o Laboratório de Referência Regional de Hantavirose da Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro-RJ.

Para obtenção das amostras a direção de hospitais da região foi informada sobre a pesquisa e recebia uma cópia do projeto. Nos casos suspeitos o pesquisador era alertado e este esclarecia ao paciente/famíliares sobre a pesquisa para obter a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (Cadastro 559/2010) (Anexo A). Oito hospitais participaram do estudo, sendo dois considerados referência no manejo clínico de pacientes com SPH.

Foram ainda incluídas no estudo amostras encaminhadas via Fundação Ezequiel Dias-MG para diagnóstico de hantavirose no laboratório de Referência Regional em Hantavírus da Fiocruz-RJ. Estas amostras foram enviadas no período de janeiro a dezembro de 2012 dos municípios de São Gotardo, Patrocínio e São Tomaz de Aquino.

4. 3 Área de estudo dos roedores

Capturas de roedores foram realizadas no município de Uberlândia, localizado no estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil (18°55'07" S, 48°16'38" W). O município localiza-se a uma altitude média de 863 metros acima do nível do mar e possui uma população de 640.000 habitantes, em uma área de 4000 Km² (135 Km² de área urbana) (IBGE, 2010). O clima é caracterizado por um clima subtropical com duas estações bem definidas, um inverno seco (maio a setembro) e um verão chuvoso (outubro a abril). A temperatura média é 22°C e a precipitação média de 1650 mm. Os locais de captura dos roedores foram caracterizados de acordo com a fitofisionomia do cerrado. No total, sete trilhas foram instaladas em diferentes áreas rurais do município (Tabela 1, Figura 5).

Tabela 1. Locais de captura dos roedores e fitofisionomias do Cerrado associadas.

Local de captura	Fitofisionomia	Referências geográficas
Fazenda do Glória	Borda de Mata Seca Semidecídua.	Latitude: 18° 57' 040 Longitude: 48° 12' 139 Altitude: 916 metros
Fazenda Veadinho	Mata de Galeria Inundável.	Latitude: 18° 57' 275 Longitude: 48° 03' 935 Altitude: 883 metros
Fazenda Fernanda	Mata Seca Semidecídua.	Latitude: 18° 57' 697 Longitude: 48° 04' 469 Altitude: 883 metros
Instituto Federal	Borda de Mata Seca Semidecídua antropizada.	Latitude: 18° 46' 509 Longitude: 48° 17' 631 Altitude: 694 metros
Chácaras Eldorado	Cerrado alterado (árvores e Brachiaria)	Latitude: 18° 59' 503 Longitude: 48° 26' 720 Altitude: 860 metros
Chácaras Bálsamo	Vereda (1° trilha) Pastagem (2° trilha)	Latitude: 19° 01' 587 Longitude: 48° 12' 010 Altitude: 889 metros
Campo Florido	Cerrado sentido restrito.	Latitude: 19° 00' 417 Longitude: 48° 19' 172 Altitude: 860 metros

Estas fitofisionomias são assim caracterizadas (Ribeiro e Walter, 2008):

- Mata Seca Semidecídua

Sob a designação Mata Seca estão incluídas as formações florestais no bioma Cerrado que não possuem associação com cursos de água, caracterizadas por diversos níveis de caducifólia durante a estação seca. A vegetação ocorre nos interflúvios, em locais geralmente mais ricos em nutrientes. A Mata Seca é dependente das condições químicas e físicas do solo mesotrófico, principalmente da profundidade. Em função do tipo de solo, da composição florística e, em consequência, da queda de folhas no período seco, a Mata Seca pode ser tratada sob três subtipos: Mata Seca Sempre-Verde, Mata Seca Semidecídua, a mais comum, e Mata Seca Decídua. Em todos esses subtipos, a queda de folhas contribui para o aumento da matéria orgânica no solo, mesmo na Mata Seca Sempre-Verde.

- Mata de Galeria Inundável:

Entende-se por Mata de Galeria Inundável a vegetação florestal que acompanha um curso de água, onde o lençol freático se mantém próximo ou sobre a superfície do terreno na maior parte dos trechos durante o ano todo, mesmo na estação seca. Apresenta trechos longos com topografia bastante plana, sendo poucos os locais acidentados. Possui drenagem deficiente e linha de drenagem (leito do córrego) muitas vezes pouco definida e sujeita a modificações.

- Vereda

A Vereda é a fitofisionomia com palmeira arbórea *Mauritia flexuosa* emergente, em meio a agrupamentos mais ou menos densos de espécies arbustivo-herbáceas. Para Magalhães (1966), esses locais formam bosques sempre-verdes. As Veredas são circundadas por campos típicos, geralmente úmidos, e os buritis não formam dossel como ocorre no Buritizal. Por essas características peculiares, autores como BRANDÃO; CARVALHO; BARUQUI (1991) se referiram à Vereda como uma “comunidade seral”, enquanto Araújo et al. (2002) sugeriram que ela deve ser considerada como um “complexo vegetacional”. Com propriedade, esses autores indicaram três zonas ligadas à topografia e à drenagem do solo, designando-as: “borda” (local de solo mais seco, em trecho campestre onde podem ocorrer arvoretas isoladas); “meio” (solo medianamente úmido, tipicamente campestre); e “fundo” (solo saturado com água, brejoso, onde ocorrem os buritis, muitos arbustos e arvoretas adensadas). Essas zonas são floristicamente diferenciadas, cujos reflexos emergem sobre a flora zonal.

- Cerrado sentido restrito

O Cerrado sentido restrito caracteriza-se pela presença de árvores baixas, inclinadas, tortuosas, com ramificações irregulares e retorcidas, e geralmente com evidências de queimadas. Os arbustos e subarbustos encontram-se espalhados, com algumas espécies apresentando órgãos subterrâneos perenes (xilopódios), que permitem a rebrota após queima ou corte. Na época chuvosa, os estratos subarbusivo e herbáceo tornam-se exuberantes, devido ao seu rápido crescimento. Os troncos das plantas lenhosas em geral possuem cascas com cortiça espessa, fendida ou sulcada, e as gemas apicais de muitas espécies são protegidas por densa pilosidade. As folhas em geral são rígidas e coriáceas. Esses caracteres sugerem adaptação a condições de seca (xeromorfismo).

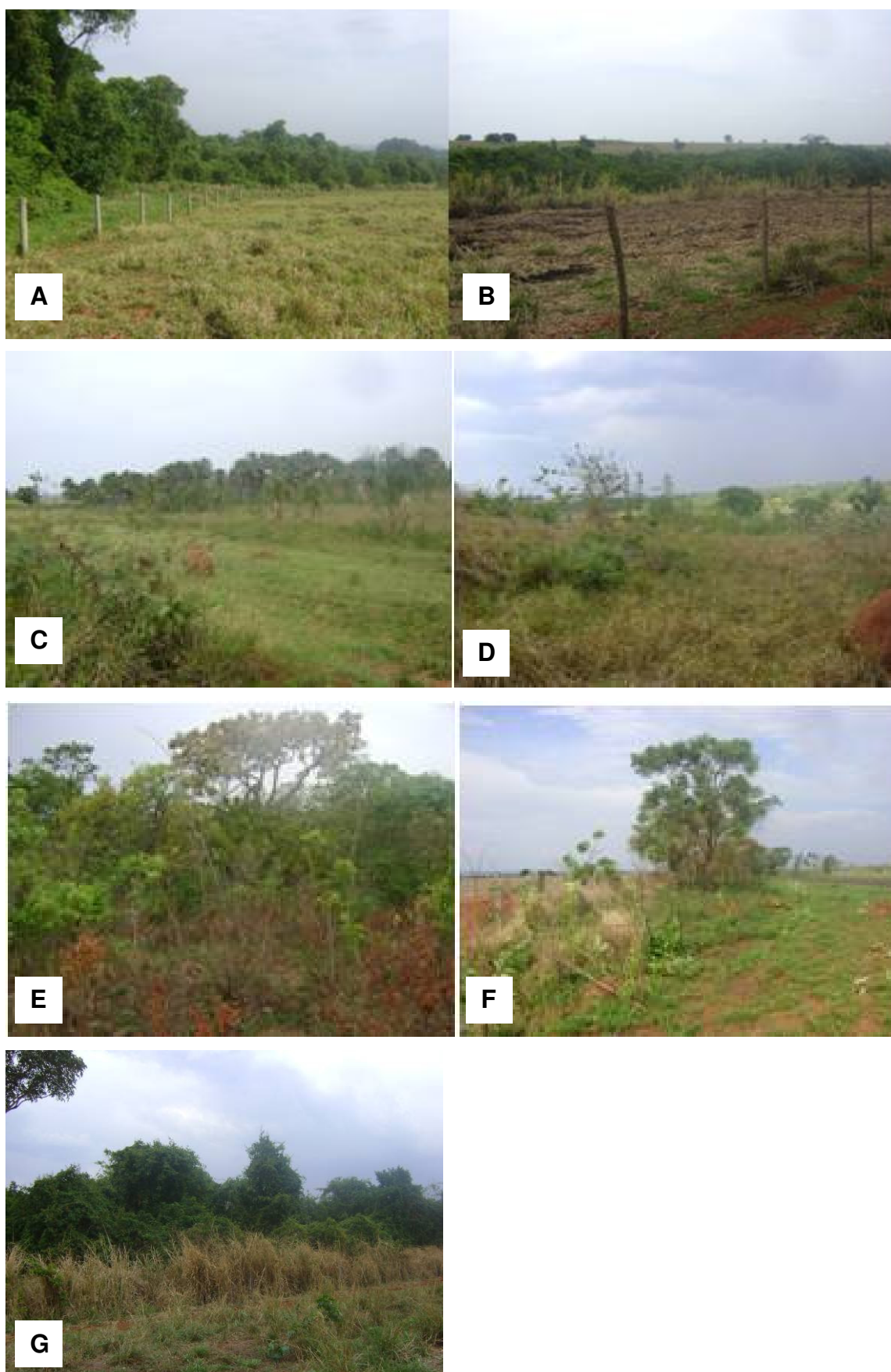


Figura 5: A. Fazenda do Glória. B. Fazenda Veadinho. C. Chácaras Balsamo. D. Chácaras Eldorado. E. Campo Florido. F. Fazenda Fernanda. G. Instituto Federal

4. 4 Amostras de roedores

Roedores foram capturados em armadilhas Sherman (7,62cm x 9,53cm x 30,48cm), apropriadas para a captura de pequenos mamíferos vivos com até 3 kg (Sherman Traps Inc., Tallahassee, FL) e Tomahawk (Tomahawk Live Trap Co., Tomahawk, Wis) entre o período de dezembro de 2011 a novembro de 2012 (Figura 6). Em cada uma das áreas escolhidas foram estabelecidos um ou dois transectos lineares na borda ou adentrando a mata, com um espaçamento de aproximadamente 10 metros entre elas. A isca utilizada foi uma mistura composta de bacon, aveia, banana e pasta de amendoim. Em cada eram utilizadas uma armadilha Tomahawk transecto para cada quatro armadilhas Sherman, totalizando 5 armadilhas Tomahawk e 15 armadilhas Sherman.



Figura 6: Armadilhas utilizadas para captura dos roedores. (A) Tomahawk (B) Sherman

Os transectos foram percorridos diariamente pela manhã para checagem das armadilhas quanto à presença de animais. As armadilhas contendo os animais foram transportadas, imediatamente após sua remoção dos transectos, para a base laboratorial de campo. Na base os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina, e tiveram seus dados bionômicos coletados (peso corpóreo e medidas de corpo e cauda), verificados quanto ao sexo, atividade reprodutiva e presença de cicatrizes (indicativo de comportamento agonístico, principal forma de transmissão de hantavírus entre roedores) (Anexo B). A estrutura etária da espécie mais abundante foi baseada nos pesos dos roedores e assim foi classificada em classes I, II e III, de acordo com o quartil em que o peso se enquadrava (MILLS et al., 2007).

4.5 Coleta de amostras dos roedores

A coleta de sangue dos animais foi realizada com os animais vivos, sob anestesia geral, e o restante das amostras (órgãos internos, e medula) após eutanásia. A eutanásia dos animais foi realizada preferencialmente por exsanguinação, com os animais sob anestesia geral conforme descrito acima. No caso de impossibilidade da exsanguinação total, o sacrifício foi realizado a com super dosagem anestésica (inoculação intra-cardíaca de Cloridrato de Ketamina (acima de 50 mg/Kg de peso) e conforme descrito em RIVERA; AMARAL; NASCIMENTO (2006) (Figura 7).

A coleta de sangue de todos os animais foi realizada por punção cardíaca. O sangue obtido foi centrifugado e o soro estocado em galões de nitrogênio líquido para posterior análise para diagnóstico sorológico de infecção por hantavírus. Foram também coletadas e acondicionadas da mesma forma amostras de órgãos (amostras de rim, fígado, baço, pulmão e coração) dos espécimes para confirmação da infecção por hantavírus através de diagnóstico molecular e tipagem dos vírus por sequenciamento do RNA viral.

Amostras de medula óssea foram obtidas para análise citogenética e cariotipagem dos roedores.

4. 6 Identificação taxonômica e preservação de material zoológico

A identificação específica da maioria das espécies foi possível por meio da análise morfológica externa, segundo BONVICINO; OLIVEIRA; D'ANDREA (2008). A técnica de cariotipagem, que visa determinar o número cromossômico diplóide e fundamental, com objetivo de descrever e associar cada complemento cromossômico à espécie confirmando a identificação morfológica será realizada posteriormente a este estudo, para a identificação dos espécimes que foram classificados apenas no nível de gênero, segundo BONVICINO et al., (2001).

Todas as carcaças dos animais coletados foram preservadas através de fixação em meio líquido (formol 10%) ou foram taxidermizados e seus esqueletos preparados, para posterior depósito como material testemunho na coleção científica do Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro-RJ.

Amostras de fígado foram também preservadas em etanol para posteriores estudos filogenéticos moleculares dos roedores quando necessário. As identificações taxonômicas foram realizadas sob a supervisão da Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino do Instituto Nacional do Câncer-RJ.

4. 7 Preparação dos cariótipos

Os cariótipos foram obtidos a partir de cultura de medula dos roedores 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 (10-6M) e brometo de etídio (5ug/ml). Após incubação os tubos eram centrifugados por 5-10 minutos e resuspendido em 10 ml de solução hipotônica fresca (KCl 0,075M). Após 30 minutos de hipotonização à temperatura ambiente uma fixação inicial era feita adicionando 1 ml de Carnoy fresco (3 metanol: 1 ácido acético) na solução hipotônica, seguido de centrifugação por 5-10 minutos. O material era então fixado em 10 ml de Carnoy para posterior processamento em laboratório (BONVICINO, 2011).

4. 8 Observação à legislação e aos protocolos de biossegurança

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (Registro CEUA/UFU 071/11) (Anexo C). A permissão para coleta de roedores em campo foi obtida no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (Licença permanente para coleta de material zoológico nº 13373) (Anexo D).

Todos os roedores capturados foram processados no campo de acordo com as normas de biossegurança (MILLS et al., 1995) (Figura 7). Todos os procedimentos com animais seguiram os protocolos de biossegurança preconizados, incluindo utilização de equipamentos de proteção individual e de proteção respiratória Nível 3 de Biossegurança (filtros HEPA P3) (Figura 8).



Figura 7: A. Anestesia. B. Biometria C. Coleta de sangue por punção cardíaca. D. Retirada de órgãos. E. Retirada de medula óssea do fêmur para análise de cariótipo. F. Armazenamento de amostras em nitrogênio líquido.



Figura 8: Medidas de biossegurança utilizadas na captura dos roedores e processamento das amostras no laboratório de campo. A. EPIs utilizados no trabalho de campo. B. Desinfecção do material cirúrgico utilizado na coleta de órgãos com CB- 30 0,5 % (Ouro fino saúde animal LTDA.) C. Desinfecção das armadilhas após término do trabalho de campo com CB- 30 0,05%. D. Coleta de todo descarte em sacos para material biológico para posterior incineração.

4.9 Análise sorológica de casos humanos de SPH

Para análise sorológica de amostras humanas utilizamos o Kit Hantec IgM, desenvolvido pelo Instituto Carlos Chagas FIOCRUZ-PR, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde para diagnóstico das hantavirose. Brevemente, *strips* de oito poços previamente adsorvidos com antígenos recombinantes purificados de hantavírus, assim como os demais reagentes, eram retirados da geladeira e deixados à temperatura ambiente por 30 minutos. Os *strips* eram então lavados com tampão de lavagem utilizando 300 µl a cada poço. Os *strips* eram então virados para baixo até o momento do uso. O diluente de amostras/conjugado era preparado com tampão PBS 10X, Tween 20 0,05%, lectina de leite 2% e água destilada. As amostras e os controles eram testados nas diluições 1/100, 1/400, 1/1600 e 1/6400, com exceção do controle positivo que era testado apenas até a diluição 1/1600. Todas as amostras eram testadas em duplicata. As *strips* ímpares eram sensibilizadas pelo antígeno recombinante específico de hantavírus e as *strips* pares com antígeno negativo.

Após a distribuição das amostras nas *strips*, estas eram seladas e incubadas a 37°C por 30 minutos. Após isso, as *strips* eram lavadas por cinco vezes com tampão de lavagem (300 µl/poço). Enquanto isso, o anticorpo secundário anti-IgM conjugado com HRP, era preparado na diluição 1/300. Após homogeneização, era adicionado 100 µl do conjugado em cada poço das *strips*. Novamente eram seladas e incubadas a 37°C por 30 minutos e lavadas conforme descritas anteriormente. Em seguida, eram distribuídos 100 µl do substrato tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após, a reação foi bloqueada utilizando 100 µl de tampão de bloqueio em cada poço. A leitura foi realizada utilizando um espectrofotômetro de microplacas equipado com filtro de 450 nm. As absorbâncias das amostras eram calculadas subtraindo as densidades óticas (DO) obtidas nas *strips* sensibilizadas com antígenos de hantavírus com as *strips* onde havia antígeno negativo. Somavam-se os valores das absorbâncias obtidos nas quatro diluições de cada amostra. A amostra era considerada positiva quando a somatória dos valores de absorbância era superior a 1,100. Eram negativas quando os valores eram inferiores a 0,900 e indeterminadas quando o somatório era igual ou superior a 0,900 e igual ou inferior a 1,100. O ensaio era considerado validado quando o somatório dos valores das absorbâncias do controle positivo fosse maior que 1,100 e do controle negativo menor que 0,400.

4. 10 Analise sorológica de roedores

Amostras de soro de roedores foram testadas para IgG contra antígenos do vírus Araraquara pelo método ELISA. Brevemente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com proteína recombinante do nucleocapsídeo do hantavírus Araraquara (ARAV-N) e um antígeno usado como controle negativo durante uma noite a 37°C. Após lavar e bloquear a placa com PBS-Tween 20 0,1% e leite em pó 5%, amostras de soro foram adicionadas. Anticorpos IgG foram detectados em uma diluição de 1:400. Anticorpos anti-*Peromyscus leucopus* e anticorpos anti-*Rattus rattus* marcados com peroxidase foram utilizados como conjugado. O substrato cromogênico usado foi o 2.2'-azinodi (3-ethylbenzthiazoline sulfonate) e a absorbância foi mensurada a 405 nm. A diluição do soro foi considerada positiva quando a DO era >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 era considerado positivo.

4. 11 Extração de RNA

As amostras de pulmão dos roedores e amostras de soro de pacientes com SPH sororreativos foram submetidas à extração do RNA viral por meio dos kits comerciais PureLink™ (Invitrogen) e QIAamp®Viral RNA mini Kit (Qiagen), respectivamente, seguindo os protocolos do fabricante.

Para a extração com o kit PureLink™ (Invitrogen) foram obtidos aproximadamente 50 mg de tecido utilizando bisturi ou tesoura estéreis e, subsequentemente, foram macerados, com um pistilo, em banho de nitrogênio líquido (NL), em uma primeira etapa, manualmente, com introdução do NL no interior do tubo. Em seguida foi adicionados 120 µl de Trizol® (Invitrogen) e o tecido foi macerado complementamente com ajuda do rotor para pistilo para a trituração completa de todo tecido. Posteriormente, 880 µl de Trizol® foram adicionados e após homogeneização em vortex o material triturado foi incubando à temperatura ambiente por 5 minutos. Na etapa seguinte 200 µl de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol® foram adicionados e o tubo foi agitado vigorosamente 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 400 µl da fase aquosa para um novo tubo devidamente identificado. Uma quantidade de 400 µl de etanol a 70% foi adicionada e após homogeneização da amostra em vortex, o tubo foi invertido para dispensar qualquer precipitado visível que pudesse ter sido formado após a adição de etanol. Subsequentemente 700 µl da mistura foram transferidos para uma coluna com tubo coletor e submetidos à centrifugação a 12.000x g por 15 segundos à temperatura ambiente. O líquido do tubo coletor foi desprezado e a coluna recolocada no mesmo tubo coletor. Essas etapas foram repetidas a partir da adição de 700 µl da mistura. Em sequência, adicionou-se 700 µl do tampão de lavagem 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 500 µl 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 1,5 mL e 30 µl de água livre de nuclease foram adicionados no centro da coluna de forma cuidadosa, seguida da incubação à temperatura ambiente por um minuto e centrifugação da

coluna com tubo de 1,5 mL a 12.000x g por 2 minutos à temperatura ambiente. O RNA extraído foi armazenado em alíquotas em freezer -80°C.

Para a extração com o kit QIAamp®Viral RNA mini Kit (Qiagen), foi adicionado 140µL de soro em 560µL de tampão de lise AVL em tubo de 1,5mL e misturado no vortex por 15s e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados rapidamente para remover gotas da parte interna da tampa. Foram adicionados 560µL de etanol (96-100%) à amostra, misturando no vortex por 15 segundos e novamente centrifugados. Após esta etapa, a mistura foi transferida para a coluna QIAamp Spin sem tocar no aro interno e com a tampa fechada foi centrifugada a 8000 rpm (6000g) por 1 minuto. Em seguida a coluna foi transferida para um tubo coletor de 2 mL limpo e o tubo contendo o filtrado foi descartado. Foram aplicados os 630µL restantes da mistura na coluna e novamente foi realizado o procedimento anterior. Após isso, foram adicionados 500µL do tampão de lavagem AW1 nas colunas QIAamp Spin, com cuidado para não tocar no aro interno e foi novamente centrifugado a 8000 RPM (6000g) por 1 minuto. Após isso, a coluna QIAamp Spin foi inserida em um tubo coletor de 2 mL limpo e o tubo contendo o filtrado foi descartado. Posteriormente foram adicionados 500µL do tampão de lavagem AW2 na coluna QIAamp Spin sem tocar no aro interno e centrifugado a 14000 RPM (20000g) por 3 minutos. A coluna QIAamp Spin foi então inserida em um tubo coletor de 2 mL limpo e o tubo contendo o filtrado foi descartado. A coluna foi então centrifugada a 14000 rpm (20000g) por 1 minuto e transferida para um tubo de 1,5 mL. Cuidadosamente a coluna QIAamp Spin foi aberta e foram adicionados 40µL de tampão de eluição AVE. A coluna foi incubada a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugada a 8000 RPM (6000g) por 2 minutos. O RNA foi então armazenado em alíquotas no freezer -80°C.

4. 12 Transcrição Reversa e PCR One Step:

A partir do RNA total extraído foram realizadas a síntese e posterior amplificação do cDNA com utilização do Mini Kit SuperScript IIITM Reverse Transcriptase (Invitrogen) e de primers específicos para o segmento S viral. Estes primers foram elaborados pelo pesquisador Alexandro Guterres, do Laboratório de Hantavíroses do Instituto Oswaldo Cruz. Os primers foram direcionados para sequências conservadas do genoma de linhagens de hantavírus brasileiros e outras linhagens sul-americanas próximas filogeneticamente (Andes, Araraquara, Araucária (Juquitiba-like), Bermejo, Maciel, Pergamino, Oran e Rio Mamoré).

Na PCR, tubos de 0,5 mL foram utilizados para preparar a solução de trabalho, que continha os primers (0,5 µl do primer H04 , 0,4 µl do primer 733R), Taq DNA polimerase, dNTPs, água *nuclease-free* (8,9 µl) , SuperScriptTM III RT (0,5 µl), tampão de 2x Mix (12,5 µl), e cloreto de magnésio 50mM (0,2 µl), 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, 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. O produto de amplificação era de aproximadamente 730 nucleotídeos.

4. 13 Semi-Nested PCR (PCR 2):

Na segunda PCR, tubos de 0,5 mL foram utilizados para preparar a solução de trabalho, que continha os primers (0,25 µl do primer H274 e 0,25 µl do primer 733R), água *nuclease free* (18,9 µl), dNTP (0,25 µl), enzima Taq platinum DNA polimerase (Invitrogen) (0,1 µl), tampão de 10xMix (2,5 µl), e cloreto de magnésio 50mM (0,75 µl), 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. O produto de amplificação era de aproximadamente 430 nucleotídeos.

4. 14 Análises dos produtos da reação de amplificação em eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose a 1,5% foi preparado em tampão TBE 0,5X. As amostras do produto de PCR foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese em tampão TBE 1X. Após a eletroforese, a visualização do DNA foi realizada após o gel ter sido submetido ao banho de GelRedTM (Uniscience) durante 06 minutos, através da luz ultravioleta por meio de transluminador.

4. 15 Purificação e sequenciamento nucleotídico

Os DNAs obtidos por PCR foram purificados utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA), segundo o protocolo do fabricante. Os fragmentos de DNA purificados foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,5%. As bandas de interesse foram excisadas dos géis com ajuda de um bisturi, pesadas e transferidas para tubos de 1,5 mL. O tampão de solubilização (PROMEGA) foi adicionado a cada tubo na proporção de 10 µl/10 mg de gel e incubado 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 1,5 mL estéreis e identificados. Em uma nova etapa foram adicionados 50 µl 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 eluato 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 20 µl, contendo: (i) DNA purificado a ser sequenciado, na concentração de 100-200 ng; (ii) 3,2 pmol de primer senso (H274) e do primer antisenso (733R) (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. Os produtos da reação de sequenciamento serão aplicadas ao sequenciador automático, modelo ABI PRISM® 3130x (Applied Biosystems).

Todos os primers utilizados neste estudo foram desenhados por Alexandro Guterres do Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, IOC, FIOCRUZ.

4. 16 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. Em seguida, as sequências obtidas foram manipuladas no programa MEGA 5.0. Uma sequência consenso foi estabelecida, e as divergências de nucleotídeos entre as sequências foram esclarecidas pela análise dos cromatogramas de sequenciamento.

4. 17 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 v. 3.1.2 (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 10 mil árvores. Depois de eliminar 10% das amostras como “burn-in” uma árvore consenso foi construída. Suporte estatístico dos clados 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.

4. 18 Análise estatística

Um banco de dados foi construído utilizando o programa EPI INFO versão 3.3.2 (DEAN et al., 2005). A análise dos dados também foi realizada utilizando-se deste programa. As relações entre parâmetros ecológicos (densidade populacional, prenhez, presença de cicatrizes) com a infecção viral foram avaliadas. O sucesso de captura foi determinado pelo número de capturas por noite, dividido pelo produto do número de armadilhas armadas (a cada noite) pelo número de noites (MILLS et al., 1997). O teste Qui quadrado ou o teste Exato de Fisher foram utilizados nas comparações para duas proporções. Diferenças foram consideradas significantes quando o valor de p mostrou-se inferior a 0,05.

5. Resultados

5.1 Roedores

No total, quatro campanhas de captura foram realizadas: 1ª campanha (06/12 a 12/12/2011), 2ª campanha (19/03 a 27/03/2012), 3ª campanha (01/08 a 08/08/2012) e 4ª campanha (13/11 a 18/11/2012). As campanhas 1, 2 e 4 foram realizadas na estação “*verão chuvoso*” e a campanha 3 durante o “*inverno seco*”. Em cada campanha foram realizadas capturas durante cinco noites, com 240 armadilhas por noite, totalizando um esforço de captura de 1200 armadilhas por campanha, distribuídas em sete trilhas em diferentes áreas rurais do município. Na 2ª campanha, porém, foram utilizadas 1100 armadilhas devido à limitação da quantidade do equipamento para a equipe de campo (Tabela 2).

No total, 258 roedores foram capturados, sendo 245 (95%) em armadilhas Sherman e 13 (5%) em armadilhas Tomahawk. Considerando que houve um esforço de 1200 armadilhas Tomahawk e de 3600 armadilhas Sherman, o sucesso de captura foi de 1,1% e 6,8%, respectivamente.

Houve um leve predomínio de espécimes machos (133; 51,6%). Do total de fêmeas, observou-se maior prevalência de prenhez durante as duas primeiras campanhas, período de estação chuvosa (Tabela 2). Analisando este fator em relação às estações “*verão chuvoso*” e “*inverno seco*” houve significância estatística ($p < 0,0001$, teste Exato de Fisher).

A estrutura etária da espécie mais abundante *N. lasiurus* foi analisada dividindo os animais em três classes, baseadas nos seus respectivos pesos, de acordo com MILLS et al., (2007). As classes etárias foram assim divididas: *N. lasiurus*: machos (Classe I ≤ 29 g; Classe II = 30-50,5 g; Classe III $\geq 50,6$ g) e fêmeas (Classe I ≤ 27 g; Classe II = 28-45 g; Classe III ≥ 46 g). Houve predomínio de indivíduos da classe III durante a estação chuvosa (60%). Durante a estação seca, o número de indivíduos classificados nas classes I e II correspondeu a 85,5%, indicando um maior percentual de indivíduos jovens na população durante este período (Figura 9).

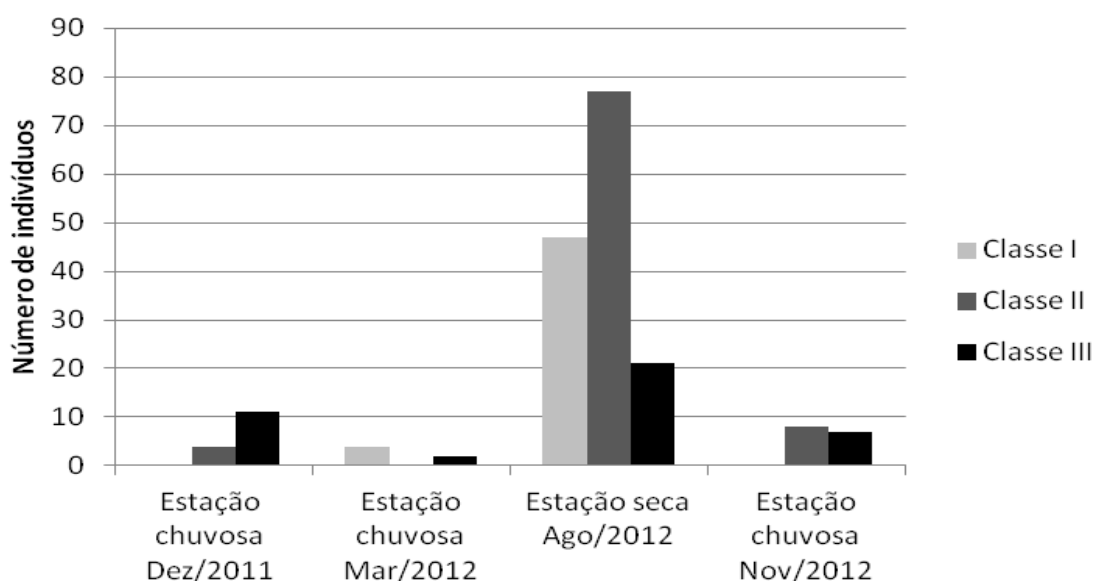


Figura 9: Distribuição de frequências dos roedores segundo classe etária e período de captura

5. 1. 1 Abundância e diversidade das espécies de roedores capturados

Foram capturados 258 roedores. Dentre estes, nove táxons foram identificados a nível específico e sete a nível genérico, todos pertencentes à subfamília Sigmodontinae (Tabela 3). As espécies mais capturadas foram *N. lasiurus* (70,1%) e *Calomys expulsus* (10,1%). Em relação à riqueza de espécies, foi possível verificar que na fitofisionomia Mata seca semidecídua mostrou-se o ambiente de maior diversidade biológica para Sigmodontinae (07 táxons a nível específico e quatro a nível genérico), seguida pela fitofisionomia Vereda (04 táxons a nível específico e três a nível genérico). O número total de animais capturados esteve diretamente relacionado à condição climática, sendo que, na estação seca este número foi significativamente maior que na chuvosa ($p < 0,0001$, teste Qui-quadrado). Na 3ª campanha de captura, durante o inverno seco, somente em uma trilha (100 armadilhas em cinco noites) foram capturados 71 roedores, com um sucesso de captura de 71%.

Considerando a condição climática, não houve significância estatística em relação ao sexo dos animais capturados e a estação de captura ($p=0,92$, teste Qui-quadrado).

Analisando o sucesso de captura dos roedores segundo os ambientes em que foram realizadas as capturas, observou-se que na fitofisionomia Mata seca semidecídua obteve-se um maior sucesso (8,1%), seguida da fitofisionomia Vereda (7,6%). O ambiente de Mata de galeria inundável apresentou o menor sucesso de captura (2,6%).

Pôde-se observar que *N. lasiurus* foi o principal roedor encontrado em todas as fitofisionomias (Mín-Máx: 50-83,7%). *Calomys expulsus* foi encontrado em quatro tipos de ambiente, ausentes apenas na *Brachiaria*.

Em nosso estudo registrou-se pela primeira vez o roedor *Cerradomys maracajuensis* no estado de Minas Gerais. A espécie foi encontrada nos ambientes de Mata seca semidecídua, Mata de galeria inundável e *Brachiaria*.

5. 1. 2 Identificação das espécies de roedores capturados

A maioria dos espécimes capturados (89,5%) foi identificada por caracteres morfológicos externos (Tabela 3). Porém, em 27 espécimes não foi possível a determinação específica por este método, e serão submetidos à confirmação de espécie por análises de cariótipo, porém, estes dados não constaram neste estudo.

5. 1. 3 Soroprevalência de anticorpos para hantavírus entre os roedores capturados

Dentre os roedores capturados, somente *N. lasiurus* apresentaram anticorpos IgG para hantavírus. No total, quatro roedores foram sororreativos e, portanto, 1,6 % de positividade. Dentre os sororreativos, três (75%) eram machos. Além disso, observou-se a presença de cicatrizes em todos os roedores sororreativos, indicativo de transmissão de hantavírus em roedores. Dentre os três espécimes machos, um pertencia à classe etária II e dois à classe etária III. O espécime fêmea pertencia à classe etária II.

5. 1. 4 Detecção de Hantavírus por RT-PCR

Dentre os quatro roedores que apresentaram anticorpos contra hantavírus, detectaram-se fragmentos do segmento S do genoma deste vírus, por RT-PCR, em três, como mostra a Tabela 4. Em uma amostra, porém, o material genético amplificado não possibilitou o sequenciamento. As amostras de roedores sequenciadas tiveram maior identidade filogenética com a amostra humana LH_206_12, com um suporte estatístico bootstrap de 94%. As amostras de roedores bem como o local provável de infecção do caso humano de SPH eram na zona rural do município de Uberlândia. As amostras de roedores, juntamente com as amostras humanas dos municípios de Uberlândia e Patrocínio (LH_206_12 e LH_180_12), estiveram mais relacionadas à variante viral Paranoá, descrita no Distrito Federal, distante em média a 463 quilômetros dos municípios de Uberlândia e Patrocínio, do que com o outro *cluster* formado por três amostras humanas, distantes em média 261 quilômetros desses dois municípios.

Tabela 2 . Taxa de sucesso de captura, características e soroprevalência para hantavírus em roedores no município de Uberlândia, Minas Gerais, 2011-2012.

Campanhas	Nº de armadilhas	Capturas	Sucesso de captura (%)	Macho (%)	Fêmea (%)	Prenhez (%)	Número de NI^a	Prevalência de hantavírus NI (%)
Dez/2011	1200	27	2,6	56	44	42	15	0
Mar/2012	1100	13	1,2	23	77	70	6	0
Ago/2012	1200	184	15,3	51	48	0	145	2,1
Nov/2012	1200	34	2,8	53	47	7	15	7,7
Total	5300	258	5	51	49	11	181	2,2

^aNI: *Necromys lasiurus*

Tabela 3. Número absoluto de espécimes de roedores capturados segundo cada ambiente e espécie no município de Uberlândia, Minas Gerais, 2011-2012 (continua).

Espécies	Ambientes					Total
	Mata Seca Semidecídua	Mata de galeria inundável	<i>Braquiaria</i>	Vereda/pastagem	Cerrado sentido restrito	
<i>Necromys lasiurus</i>	59	26	36	48	12	181
<i>Calomys expulsus</i>	16	3	0	2	5	26
<i>Calomys</i> sp.	10	0	0	0	2	12
<i>Calomys tener</i>	2	1	0	0	3	06
<i>Cerradomys</i> sp.	3	0	2	1	0	06
<i>Oxymycterus delator</i>	0	0	0	5	0	05
<i>Cerradomys maracajuensis</i>	1	1	2	0	0	04
<i>Cerradomys subflavus</i>	3	1	0	0	0	04
<i>Oligoryzomys</i> sp.	0	0	2	2	0	04
<i>Oligoryzomys fornesi</i>	1	0	0	1	0	02
<i>Cerradomys scotti</i>	0	0	0	0	2	02
<i>Oxymycterus</i> sp.	0	0	0	2	0	02

Tabela 3. Número absoluto de espécimes de roedores capturados segundo cada ambiente e espécie no município de Uberlândia, Minas Gerais, 2011-2012 (continuação).

Espécies	Ambientes					Total
	Mata Seca Semidecídua	Mata de galeria inundável	<i>Braquiaria</i>	Vereda/pastagem	Cerrado sentido restrito	
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	1	0	0	0	0	01
<i>Oecomys</i> sp.	1	0	0	0	0	01
<i>Nectomys</i> sp.	0	0	1	0	0	01
<i>Hylaeamys</i> sp.	1	0	0	0	0	01
Total	98	32	43	61	24	258

Tabela 4. Amostras de roedores positivas na pesquisa de hantavírus por sorologia e/ou PCR (pulmão).

Nº da amostra	Data de coleta	Espécie	Sexo	ELISA	PCR	Hantavírus
LBCE 17402	05/08/2012	<i>N. lasiurus</i>	Macho	Reativo	Negativo	-
LBCE 17837	05/08/2012	<i>N. lasiurus</i>	Macho	Reativo	Positivo	-
LBCE 17849	06/08/2012	<i>N. lasiurus</i>	Fêmea	Reativo	Positivo	Araraquara
LBCE 18197	18/11/2012	<i>N. lasiurus</i>	Macho	Reativo	Positivo	Araraquara

5. 2 Humanos

Entre seis casos de SPH confirmados sorologicamente, em cinco (83.3%) foram amplificados produtos de PCR de tamanho esperado (Tabela 5). A coleta de soro foi em média quatro dias após o início dos sintomas. Estes soros foram utilizados tanto para análise sorológica quanto para as técnicas moleculares.

Dentre os pacientes acometidos pela SPH, todos eram do sexo masculino, com idade média de 33.9 ± 12.9 anos. A taxa de letalidade dos casos foi de 50% (Tabela 5). Os sintomas clássicos de febre, cefaleia, dispneia, mialgia e tontura foram observados em todos os pacientes (Tabela 6). O tempo médio de evolução dos sintomas, desde seu início até a hospitalização, foi de $4 \pm 1,5$ dias. A tosse seca, que é indicativo da forma clínica mais severa, a SPH, foi observada em cinco pacientes. Porém, analisando a presença de tosse seca em relação à evolução clínica para o óbito, não houve significância estatística ($p < 0,14$, teste Exato de Fisher).

Em relação às atividades de risco, 85,7% dos casos exerceram atividades agrícolas de forma ocupacional ou ocasional até 60 dias antes do início dos sintomas. Dentre as ocupações, quatro (57,1%) eram trabalhadores rurais, (28,6%) dois eram motorista/tratorista e um (14,3%) era empresário.

Cinco casos (71,4%) ocorreram no quadrimestre entre abril e agosto, evidenciando o perfil sazonal típico da SPH nesta região.

A análise filogenética das sequências de nucleotídeos mostrou a circulação apenas do genótipo Araraquara. Este hantavírus forma um clado com outros dois hantavírus que circulam na Argentina, Maciel vírus e Pergamino vírus, transmitidos pelos roedores *Necromys benefactus* e *Akodon azarae*, respectivamente. Houve a formação de um *cluster* bem definido

entre três amostras, com um suporte estatístico bootstrap de 100%. As amostras LH-Nat, LH_212_12 e LH_197_12 estavam filogeneticamente mais relacionadas. As duas primeiras são oriundas de pacientes dos municípios de Rio Paranaíba-MG e São Gotardo-MG, respectivamente, distantes entre si apenas 30 quilômetros. No entanto, a amostra LH_197_12 oriunda de um paciente de São Tomás de Aquino, município distante a 384 quilômetros de São Gotardo, teve maior relação filogenética com a amostra desse município (LH_212_12). A amostra LH_180_12, oriunda de um paciente do município de Patrocínio-MG, juntamente com a amostra LH_206_12, de um paciente de Uberlândia-MG, foram as amostras mais divergentes no clado formado por amostras desta casuística. A amostra LH_180_12 teve maior identidade filogenética com a variante do hantavírus Araraquara denominada Paranoá, com um suporte estatístico bootstrap de 61%. Esta variante ocorre no Distrito federal, distante em média 400 quilômetros de nossa área de estudo.

Tabela 5. Dados epidemiológicos de pacientes de SPH e resultados de sequenciamento viral em área endêmica de Minas Gerais, Brasil, 2011-2012.

Amostra	Localidade (Município)	Sexo	Idade	Início de sintomas	Data de coleta	Desfecho	ELISA	PCR	Hantavírus
LH_NAT	Rio Paranaíba	Masculino	40	16/08/2012	19/08/2012	Sobrevida	Reativo	Positivo	Araraquara
LH_206_12	Uberlândia	Masculino	55	28/05/2012	03/06/2012	Sobrevida	Reativo	Positivo	Araraquara
LH_JOS	Uberlândia	Masculino	27	23/03/2012	27/03/2012	Sobrevida	Reativo	Positivo	-
LH_180_12	Patrocínio	Masculino	30	25/03/2012	28/03/2012	Morte	Reativo	Positivo	Araraquara
LH_197_12	São Tomás de Aquino	Masculino	31	27/04/2012	02/05/2012	Morte	Reativo	Positivo	Araraquara
LH_212_12	São Gotardo	Masculino	17	14/06/2012	18/06/2012	Morte	Reativo	Positivo	Araraquara

Tabela 6 - Sinais e sintomas apresentados por sete pacientes com SPH em área endêmica de Minas Gerais, Brasil, 2011-2012.

Sinais/Sintomas	Frequência (n=06)	
	N	%
Febre	7	100,0
Dispneia	7	100,0
Mialgias	7	100,0
Cefaleia	7	100,0
Tontura	7	100,0
Hipotensão	6	85,7
Dor torácica	5	71,4
Tosse	5	71,4
Náuseas/Vômitos	3	42,8
Dor lombar	3	42,8
Insuficiência respiratória aguda	3	42,8
Diarréia	2	28,6

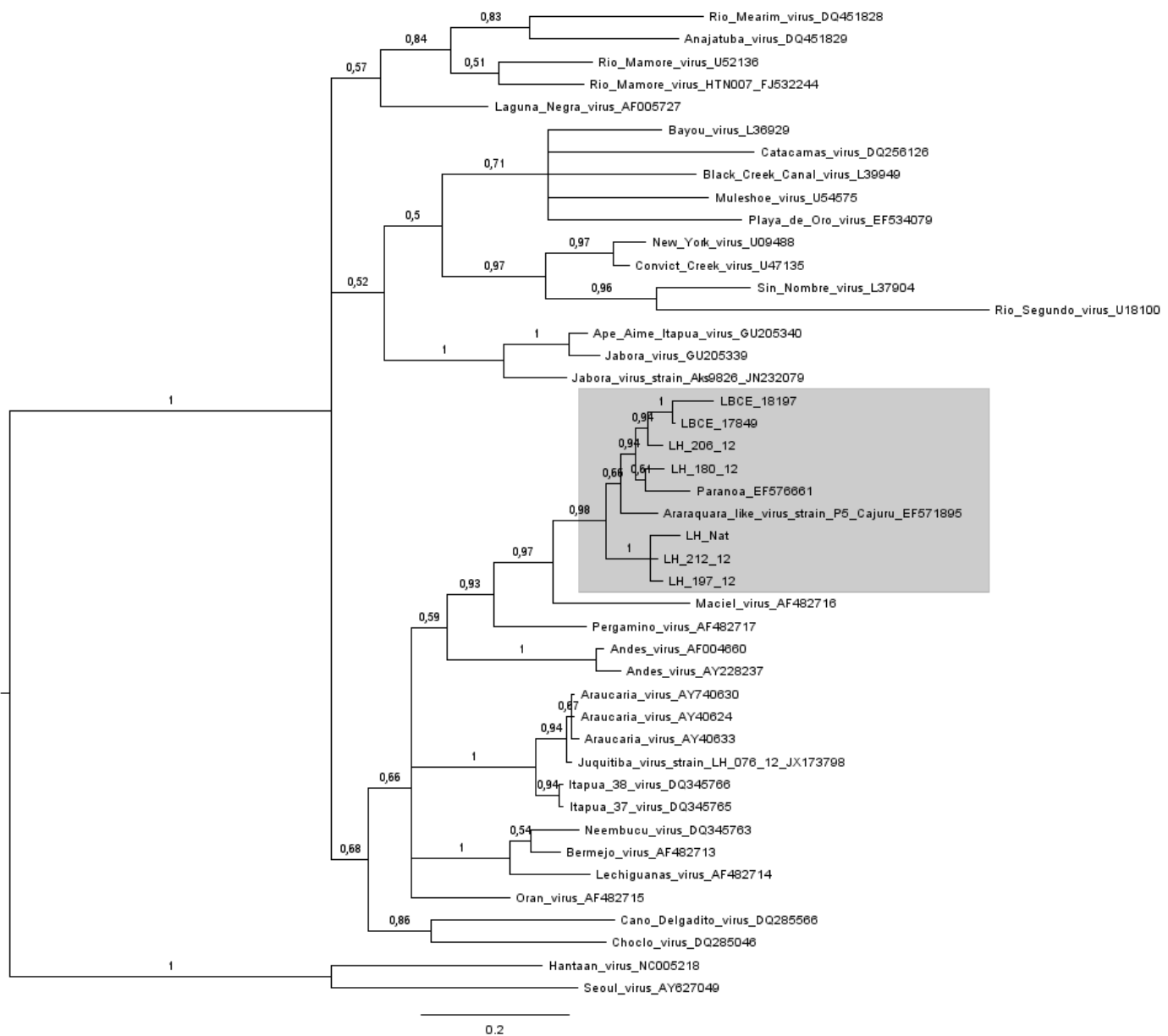


Figura 10. Relações filogenéticas entre hantavírus baseadas em uma análise bayesiana das distâncias genéticas geradas a partir de comparações das sequências de um fragmento de 382-nt do gene da proteína do nucleocapsídeo. As sequências de nucleotídeos foram analisadas por uma análise bayesiana com o programa MrBayes versão 3. 1. 2, usando o modelo General Time Reversible +G de substituição de nucleotídeos. A barra de escala indica uma sequência de divergência de 0,2. O valor numérico nos cladogramas indica as probabilidades posteriores (pp) que suportam as ramificações interiores. Os nomes das ramificações incluem o número de acesso no GenBank e a espécie viral ou cepa analisada.

6. Discussão

Os roedores constituem a ordem mais abundante e diversificada de mamíferos no mundo. A associação destes com doença humana existe desde a idade média durante as epidemias de peste e ainda hoje representam um grave risco para a saúde pública, com transmissão direta ou indireta de uma grande diversidade de patógenos (MEERBURG, SINGLETON, KIJLSTRA, 2009). Este fato tem estimulado o interesse em pesquisas ecoepidemiológicas desses reservatórios, que atuam tanto como hospedeiro de microorganismos quanto de vetores como pulgas, carrapatos e ácaros.

As populações de roedores são afetadas por condições meteorológicas e sob esses cenários de mudanças climáticas, pode ocorrer uma maior interação entre os seres humanos e os roedores, com maior risco de transmissão de doenças. O estudo destes reservatórios é um componente essencial em qualquer ação de saúde pública relacionada a doenças zoonóticas emergentes. Entre os focos de pesquisa, destacam-se as pesquisas relacionando a distribuição geográfica dos hospedeiros, a frequência relativa de infecção nas subpopulações de hospedeiros e a dinâmica temporal das populações de hospedeiros e patógenos (MILLS; CHILDS, 1998).

Em muitos lugares os roedores vivem em estreito contato com populações humanas, animais domésticos e de criação. Em outras situações, roedores periurbanos formam um elo entre populações de animais silvestres e humanos, expondo o homem às zoonoses circulantes em ecossistemas naturais. Além disso, as mudanças climáticas globais, bem como a ocupação humana de novos ambientes, podem afetar a distribuição de roedores e seus patógenos e ectoparasitos relacionados (GITHEKO et al, 2000). O clima (temperatura, chuva etc) é um importante fator abiótico que influencia na característica do habitat e na disponibilidade de alimento. O clima também influencia no estado do patógeno, visto que diversos agentes etiológicos necessitam de condições específicas de umidade, calor entre outros aspectos para sobreviver no ambiente quando fora do hospedeiro.

A interação entre diferentes espécies de roedores e humanos em atividades de campo, condições de acampamento e em atividades agrícolas são fatores de risco para doenças transmitidas por roedores. Em muitos lugares do mundo áreas silvestres são transformadas em áreas agrícolas, porém espécies silvestres nativas remanescentes ainda permanecem nestes locais (MINO et al. 2007; MOHR et al. 2007).

As relações entre roedor-patógenos e suas interações com o homem são complexas e difíceis de serem estabelecidas (MEERBURG, SINGLETON, KIJLSTRA, 2009). Além disso, levando em conta não somente a densidade de roedores, mas também a diversidade de hospedeiros faz com que estas relações sejam ainda mais complexas. Em um recente estudo, por exemplo, foi mostrado que a presença do roedor *Myodes glareolus*, reduz a prevalência de *Bartonella* em outro roedor, o *Apodemus sylvaticus* (TELFER et al. 2005). Em nosso estudo foram capturados nove táxons identificados a nível específico e sete a nível genérico, todos pertencentes à subfamília *Sigmodontinae*. Este dado reflete o território em que os roedores foram capturados, todos silvestres sem proximidade com áreas periurbanas, o que diminuiu a probabilidade de ocorrência de roedores sinantrópicos dentre os espécimes capturados, apesar de que em muitas áreas rurais/silvestres na área de estudo, estes roedores já foram encontrados (LIMONGI et al., 2013).

A perda e a fragmentação de habitat, resultantes de atividades humanas, constituem as maiores ameaças aos mamíferos terrestres no Brasil. Elas estão relacionadas ao desenvolvimento econômico através do crescimento de áreas cultivadas e urbanas, aumento da densidade populacional e aumento da malha rodoviária (COSTA et al., 2005). Apesar de o Cerrado ser um bioma emblemático no que se refere à degradação de ambiente e perda de biodiversidade, neste estudo pode-se ainda observar uma riqueza de espécies de roedores importante, raramente observada em outros estudos (BARROS-BATTESTI et al, 2000; BONVICINO; LINDBERGH; MAROJA, 2002). A espécie *Cerradomys maracajuensis*, até então relatada no Brasil apenas no centro-sul do estado do Mato Grosso e região central do Mato Grosso do Sul, foi encontrada em três fitofisionomias da nossa área de estudo. O roedor *Oligoryzomys fornesi*, reservatório do hantavírus Anajatuba no Maranhão, também foi capturado em duas fitofisionomias (ROSA et al., 2010). Espécimes do gênero *Calomys*, reservatórios de arenavírus, hantavírus entre outros patógenos, também foram capturados. Além destas, outras espécies potenciais reservatórios de patógenos também foram capturadas. Embora os riscos variem entre os diferentes patógenos, a vigilância de populações de roedores é importante para prever a prevalência no futuro de doenças emergentes e ser capaz de identificar doenças novas ou ainda não relatadas.

Dentre as espécies capturadas, *N. lasiurus* foi a mais prevalente (70,1%). A habilidade de se adaptar em ambientes antrópicos, especialmente em áreas com presença de gramíneas (*Brachiaria* sp.) e culturas de cana de açúcar é característico dessa espécie. Estes roedores são agressivos e geralmente dominam a área que infestam (STREILEN, 1982). O comportamento

generalista da espécie o favorece nestes ecossistemas menos complexos. *N. lasiurus* é considerado o principal reservatório do hantavírus Araraquara e é endêmico em todo bioma Cerrado, Caatinga e ao longo do ecótono Mata Atlântica-Cerrado (SUZUKI et al., 2004; BONVICINO; OLIVEIRA; D'ANDREA, 2008). O bioma Cerrado, nas últimas décadas, tem passado por um processo de degradação intenso, com imensas áreas de plantio de monoculturas (RIBEIRO; WALTER, 2008). O padrão ecológico de *N. lasiurus*, associado com as profundas mudanças antrópicas neste bioma, aumenta sobremaneira as chances de contato entre humanos e roedores infectados, devido principalmente ao potencial aumento da densidade populacional destes roedores e do estreitamento de ambientes compartilhados com os seres humanos.

MARINHO-FILHO et al. (1994) salientam que *N. lasiurus* representa mais de 30% dos indivíduos capturados na maioria das áreas amostradas no bioma Cerrado. Outros estudos realizados no Cerrado do Distrito Federal apontam densidade máxima de 14.3 a 27.0 indivíduos/ha para essa espécie (ALHO, 1981; HENRIQUES et al., 1997). Em nosso estudo, com exceção do transecto do Instituto Federal, onde apenas cinco espécimes foram capturados (dois *Cerradomys subflavus*, um *Cerradomys maracajuensis* e dois *Cerradomys* sp.), em todos os outros transectos, *N. lasiurus* representou no mínimo 50% do total de espécimes capturados (Mín-Máx: 50-83,7%). Além disso, no transecto da Fazenda Fernanda durante a estação inverno, o sucesso de captura foi de 71%. Considerando que cada transecto corresponde a uma linha reta de mais ou menos 200 metros de distância, podemos inferir que a densidade populacional por hectare nesta área deveria ser naquele momento maior do que o relatado na literatura. Esta prevalência consideravelmente maior de *N. lasiurus* neste estudo em relação aos relatos do passado em áreas de cerrado semelhantes pode ter relação direta com as transformações ocorridas no Cerrado nas últimas décadas, o que favoreceu esta espécie na competição interespecífica com outros roedores, a maioria delas especialistas de hábitat.

MARES et al. (1986) encontrou *N. lasiurus* distribuída nas diferentes fisionomias do Cerrado, exceto em florestas de galeria e vereda, considerando-a generalista quanto à utilização de hábitat. Em nosso estudo, porém, esta espécie correspondeu a 81,3% e 80,3% dos espécimes capturados nas fitofisionomias mata de galeria e vereda, respectivamente, considerando, porém, que nesta última havia uma interface no transecto com um campo de pastagem. No entanto, *N. lasiurus* parece preferir áreas abertas menos densas e pode ocorrer também em áreas bastante alteradas (VIEIRA; PALMA, 2005).

ALHO E PEREIRA (1985) e ALHO et al. (1986) investigaram a variação sazonal na abundância de pequenos mamíferos de Cerrado e detectaram diferenças significativas entre a estação seca e chuvosa, com um maior número de capturas na estação seca. Esses dados corroboram o observado em nosso estudo onde houve diferença significativa na taxa de captura durante essas duas estações. Houve maior sucesso de captura durante a estação seca e maior taxa de prenhez entre as fêmeas na estação chuvosa. Como relatado anteriormente, a maior disponibilidade de alimento durante o período de chuvas, favorece a reprodução de roedores neste período. Consequentemente, haverá um aumento da população, que passa a ser observado com maior evidência durante a estação seca (BERGALLO; MAGNUSSON, 1999; LIMONGI et al., 2013).

Em nosso estudo os roedores da espécie *N. lasiurus* foram divididos em três classes etárias, utilizando como referência a massa corporal e o sexo dos animais. De uma forma geral, podemos considerar que a classe I, composta por indivíduos menores e mais leves, representa os animais jovens. Em contrapartida, a classe II, composta por indivíduos com peso intermediário, representa uma população de transição de sub-adultos a adultos e a classe III, com indivíduos mais pesados, representa exclusivamente os indivíduos adultos. Em nosso estudo, na estação chuvosa houve predomínio de indivíduos das classes II e III, muitos deles provavelmente remanescentes da estação seca anterior. Na estação seca, pelo contrário, houve maior prevalência das classes I e II, representando uma maior densidade populacional constituída principalmente por indivíduos mais jovens. Em outro estudo realizado na área rural e periurbana do município de Uberlândia, também houve a maior ocorrência de indivíduos adultos na estação chuvosa, inclusive com maior prevalência de prenhez entre as fêmeas (Limongi *et al.*, 2013). Neste estudo também houve significância estatística quando comparado a soroprevalência de anticorpos contra hantavírus nos roedores entre as estações do ano, com maior prevalência durante a estação verão chuvoso. A baixa soroprevalência no inverno é resultado do baixo número de adultos (que apresentam alta soroprevalência) dentro de uma população densa composta principalmente por indivíduos jovens (geralmente não infectados). Por outro lado, no verão chuvoso, a população que é composta principalmente de adultos, contribuiu para a alta soroprevalência. Isto também foi observado na Argentina, onde a maior densidade populacional de adultos de *Akodon azarae* contribuiu para o aumento da soroprevalência (SUÁREZ et al., 2003). Em nosso estudo, porém, dentre os quatro roedores sororeativos, três (75%) foram capturados no mês de agosto, durante a estação inverno seco. Entretanto, acreditamos que esta estimativa não reflete bem o parâmetro populacional, devido

ao fato da amostra ser relativamente pequena. No entanto, em relação à idade, os quatro roedores sororreativos eram pertencentes à classe II ou III (sub-adultos ou adultos).

Todos os roedores sororreativos apresentavam cicatrizes nas orelhas e/ou cauda. A presença de cicatrizes nos roedores, principalmente nas orelhas e cauda, está associado com sororreatividade para hantavírus e estudos em roedores reservatórios demonstram que a prevalência da infecção é maior em adultos machos do que em fêmeas e jovens, sugerindo que a transmissão horizontal é o principal mecanismo de manutenção do vírus na natureza (ABBOTT; KSIAZEK; MILLS, 1999, CALISHER et al, 2007; CANTONI et al., 2001; MADHAV et al, 2007; LIMONGI et al., 2013, PEARCE-DUVET et al, 2006).

As sequências nucleotídicas das duas amostras de roedores procedentes do município de Uberlândia-MG mostraram alta identidade filogenética com a sequência obtida de uma amostra humana do mesmo município (suporte estatístico bootstrap de 94%). Este dado corrobora com a definição de *N. lasiurus* como o principal reservatório do hantavírus no bioma Cerrado.

A formação de dois subclados bem definidos, um formado por amostras dos municípios de Uberlândia-MG e Patrocínio-MG e o outro por amostras dos municípios de São Gotardo-MG, Rio Paranaíba-MG e São Tomás de Aquino-MG sugere a possibilidade de algum isolamento geográfico. Porém, a amostra deste último município, distante a 384 quilômetros das outras amostras do seu subclado, gera uma incógnita na análise da distribuição espacial de ARAV. Além disso, o subclado formado por amostras de roedores, juntamente com as amostras humanas dos municípios de Uberlândia e Patrocínio, estiveram mais relacionadas à variante viral Paranoá, descrita no Distrito Federal, distante em média a 463 quilômetros dos municípios de Uberlândia e Patrocínio, do que com o outro clado formado por três amostras humanas, distantes em média 261 quilômetros desses dois municípios. Estudos moleculares mais extensivos são necessários para esclarecer a distribuição espacial das variantes de ARAV e correlacioná-las com o espectro clínico da doença humana, bem como sua ocorrência em reservatórios.

As regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, bem como o sudoeste do estado de Minas Gerais representam as principais áreas de transmissão de hantavírus no país, devido à sua incidência sazonal importante e alta letalidade. No entanto, desde o registro do primeiro caso de SPH no estado no ano de 1998, somente três estudos moleculares realizados no Brasil incluíram amostras humanas de casos de SPH destas regiões, analisando por filogenia nos três estudos apenas 15 amostras, oriundas dos municípios de Araxá (1), Patrocínio (4), Uberlândia

(2), Uberaba (4), Patos de Minas (1), São Tomás de Aquino (1), São Sebastião do Paraíso (1) e Passos (1). Neles se associou os casos de SPH principalmente ao ARAV, possivelmente o mais virulento dos hantavírus brasileiros (ARAÚJO, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 2004).

O roedor *Necromys lasiurus*, que ocorre em áreas de Cerrado e Mata Atlântica, foi implicado como o reservatório do ARAV. Porém, evidências da circulação do hantavírus Juquitiba (JUQV), assim como de uma linhagem altamente divergente de ARAV e JUQV foram relatadas em humanos e roedores, respectivamente, nestas áreas (ARAÚJO, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 2004). Em um destes estudos, um vírus relacionado ao JUQV foi relatado em amostras de soro humano provenientes dos municípios de Uberaba, Patrocínio, São Sebastião do Paraíso e Passos (ARAÚJO, 2010). O JUQV tem como reservatório o roedor *Oligoryzomys nigripes*, que habita principalmente as florestas de araucárias em áreas temperadas do sul do Brasil e também a Mata Atlântica. Porém, este roedor também ocorre no bioma Cerrado, nos estados de Minas Gerais e Distrito Federal (BONVICINO; OLIVEIRA; D'ANDREA, 2008). Em estudo de reservatórios de hantavírus no município de Uberlândia-MG foram encontrados cinco espécimes de *O. nigripes*, porém sem sorologia reativa para hantavírus (LIMONGI *et al.*, 2013). A cepa viral JUQV é frequentemente relacionada aos casos de SPH que ocorrem no sul do Brasil e no estado de São Paulo e nunca antes havia sido relacionada a casos de SPH no estado de Minas Gerais (SUZUKI *et al.*, 2004; RABONI *et al.*, 2009; JONSSON *et al.*, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Em nosso estudo, em amostras dos municípios de Patrocínio e São Tomás de Aquino, municípios localizados a 23 quilômetros do município de São Sebastião do Paraíso encontraram apenas o genótipo ARAV. No mesmo estudo onde JUQV foi relatado no estado de Minas Gerais, o ARAV também foi relatado nos municípios de Passos, Teófilo Otoni, Uberlândia, Uberaba, Patos de Minas, São Tomás de Aquino, Sete Lagoas e Piumhi. Estes dados corroboram com o encontrado em nosso estudo no município de Uberlândia, onde somente o genótipo ARAV foi encontrado.

Uma linhagem altamente divergente dos genótipos ARAV e JUQV foi identificado em um roedor *N. lasiurus* no município de São Gotardo-MG recentemente. No mesmo estudo, em outro *N. lasiurus* capturado no mesmo município, o genótipo ARAV foi sequenciado (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Em nosso estudo, porém, em uma amostra humana desse município, além de outra amostra humana do município de Rio Paranaíba, localizado a 30 quilômetros de São Gotardo-MG, somente o genótipo ARAV foi identificado.

Em um estudo de filogenia de genótipos de hantavírus em amostras do sul e sudeste do Brasil, a sequência viral de um paciente com SPH do município de Patrocínio-MG foi a que apresentou a maior divergência entre os membros do clado Araraquara (16,7%) (SUZUKI *et al.*, 2004). Ainda neste estudo, outra sequência viral extraída do pulmão de um roedor *N. lasiurus* no município de Uberlândia, também se mostrou altamente divergente em relação aos demais genótipos do clado Araraquara. Com exceção da amostra humana de Patrocínio, todas as outras eram oriundas de pacientes de SPH ou roedores do estado de São Paulo. Na análise filogenética da nossa casuística, a amostra LH_180_12, de um paciente que foi a óbito no município de Patrocínio, juntamente com a amostra LH_206_12, de um paciente de SPH do município de Uberlândia, também foram as mais divergentes entre as amostras do clado.

Houve a formação de um *cluster* bem definido entre as amostras LH_212_12 e LH_197_12 de pacientes distantes geograficamente (384 quilômetros). Em um estudo semelhante, o autor sugere a possibilidade da movimentação de pessoas infectadas ou a dispersão de roedores infectados para outras áreas, o que poderia levar a um viés na interpretação dos dados (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Em nosso estudo, porém, os locais prováveis de infecção dos dois pacientes foram comprovadamente em seus municípios de residência. Além disso, é pouco provável uma dispersão significativa de roedores silvestres, que diferem sobremaneira no comportamento em relação aos roedores sinantrópicos.

Altas taxas de letalidade são observadas nas regiões onde o genótipo ARAV é endêmico no Brasil (Planalto Central e região sudeste) em comparação com áreas de ocorrência do JUQV (parte do sudeste e região sul) (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Em nosso estudo a letalidade de 50% dos casos de SPH oferece indícios de que o genótipo ARAV seja o mais prevalente na área estudada, podendo haver sobreposição com o genótipo JUQV, além de outras variantes virais em algumas áreas. Nossos dados, assim como àqueles relatados nos únicos três estudos onde haviam amostras do estado de Minas Gerais, corroboram com esta hipótese (ARAÚJO, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 2004). A ocorrência de diferentes genótipos/variantes virais pode explicar o espectro clínico da hantavirose que varia de infecções assintomáticas a casos com altas taxas de letalidade (LIMONGI *et al.*, 2007; LIMONGI *et al.*, 2009).

As amostras analisadas neste estudo são de uma extensa área com ecossistemas naturais em grande parte degradados como consequência de agricultura intensiva e pecuária. Estas alterações ambientais e demográficas ocorridas nas últimas décadas provavelmente afetou a ecologia dos roedores silvestres e facilitou a ocorrência de infecções humanas por

hantavírus e a emergência da SPH nesta região, principalmente por ARAV, que ocorre por mais de 1.000 quilômetros desde a região norte do cerrado até áreas de mata atlântica no estado de São Paulo (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

As amostras identificadas com ARAV analisados no presente estudo foram distribuídas a uma distância de aproximadamente 400 quilômetros. Tal como foi descrito com outros hantavírus, fatores biogeográficos tais como migrações alopátricas, separação geográfica e isolamento dos reservatórios podem estar envolvidos na distribuição do ARAV observada neste estudo (MORZUNOV *et al.*, 1998). Estudos envolvendo a caracterização dos hantavírus associados com as manifestações clínicas da SPH podem auxiliar na determinação dos fatores que influenciam na da doença.

A SPH exibe um perfil sazonal típico nas regiões do Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba e Sudoeste Mineiro, ocorrendo a maioria dos casos no quadrimestre entre abril e agosto. Os principais fatores associados a este padrão da doença são o clima seco e frio, falta de água e alimento para roedores no campo, ocasionando invasão destes animais em ambientes antropizados, além da colheita de grãos, o que estreita o contato homem-roedor (Limongi *et al.*, 2007). Em nosso estudo este padrão foi característico, com 71,4% dos casos ocorrendo neste período de risco.

7. Conclusões

- A grande diversidade de espécies de roedores observada neste estudo demonstra um maior potencial de ocorrência de doenças zoonóticas emergentes associadas a estes animais;

- Houve maior prevalência de *N. lasiurus*, encontrado em todas as fitofisionomias analisadas e com maior ocorrência em ecossistemas alterados;

A dinâmica populacional dos roedores está estritamente associada às condições climáticas e a oferta de alimento, com uma densidade populacional de indivíduos jovens elevada no inverno seco e com maior número de adultos no verão chuvoso, inclusive com alta taxa de prenhez;

- A formação de clados bem definidos entre amostras de hantavírus de localidades próximas sugere o isolamento geográfico dessas variantes virais;

- A ocorrência de alta identidade filogenética na sequência de nucleotídeos entre amostras distantes geograficamente estabelece uma incógnita que deve ser investigada quanto à evolução molecular dessas variantes;

- A ocorrência apenas do genótipo ARAV em espécimes de *N. lasiurus* e humanos observada neste estudo, não exclui a possibilidade de co-circulação de outros genótipos virais nessa área, além da possibilidade da existência de outros reservatórios de hantavírus, inclusive não roedores;

- Estudos ecoepidemiológicos avaliando outros potenciais reservatórios irão contribuir no entendimento da distribuição e da manutenção dos hantavírus na natureza.

8. Referências bibliográficas

- ABBOTT, K. D; KSIAZEK, T. G; MILLS, J. N. Long-term hantavirus persistence in rodent populations in Central Arizona. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, p. 102-112, 1999.
- AHN, C. et al. Detection of Hantaan and Seoul viruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) in renal syndrome patients with hemorrhagic fever. **Clinical Nephrology**, Oberhaching-Deisenhofen, v. 53, p.79-89, 2000.
- ALHO, C. J. R PEREIRA, L. A. Population ecology of a cerrado rodent community in a central Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 45, p. 597-607,1985.
- ALHO, C. J. R, PEREIRA, L. A; PAULA, A. C. Patterns of habitat utilization by small mammal populations in cerrado biome of central Brazil. **Mammalia**, Paris, v. 50, p.447-460, 1986.
- ALHO, C. J. R. Small mammal populations of Brazilian cerrado: the dependence of abundance and diversity on habitat complexity. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 223-230, 1981.
- ANISIMOVA, M; GASCUEL, O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. **Systematic Biology**, Washington, v.55, p.539-552, 2006.
- ARAI, S. et al. Hantavirus in northern short-tailed shrew, United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 13, p. 1420–1423, 2007.
- ARAI, S. et al. Phylogenetically distinct hantaviruses in the masked shrew (*Sorex cinereus*) and dusky shrew (*Sorex monticolus*) in the United States. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Lawrence, v. 78, n. 2, p. 348-351, 2008.
- ARAÚJO, G. M. et al Composição florística de veredas no Município de Uberlândia, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 475-493, 2002.

ARAÚJO, J. **Detecção molecular de hantavírus pela técnica de Real-Time em amostras de roedores silvestres coletadas na região do Vale do Ribeira no estado de São Paulo.**

2010. 111 f. Tese (Microbiologia)- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

ARAUJO, J. et al. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in Sao Paulo, Brazil. **BMC Research Notes**, v. 5, p. 690, 2012.

BARROS-BATTESTI, D. M. et al. Land fauna composition of small mammals of a fragment of Atlantic Forest in the State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 241-249, 2000.

BERGALLO, H. G; MAGNUSSON, W. E. Effects of climate and food availability on four rodent species in southeastern Brazil. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 80, p.472-486, 1999.

BOHLMAN M. C. et al. Analysis of Hantavirus Genetic Diversity in Argentina: S Segment-Derived Phylogeny **Journal of Virology**, Baltimore, v. 76, n. 8, p. 3765-3773, 2002.

BOHLMAN, M. C. et al. Analysis of hantavirus genetic diversity in Argentina: S segment-derived phylogeny. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 76, p. 3765–3773, 2002.

BONVICINO, C. R. Diversidade cariotípica em roedores Akodontini do Brasil. **Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia**, Rio de Janeiro, n. 62, p. 7-13, 2011.

BONVICINO, C.R.; D´ANDREA, P.S.; BORODIN, P. Pericentric inversion: a study in natural population of *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia: Sigmodontinae). **Genome**, Ottawa, v. 44, p. 791-796, 2001.

BONVICINO, C.R.; OLIVEIRA, J. A.; D´ANDREA, P.S. **Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos.** Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Febre Aftosa- OPAS/OMS, 2008, 120 p.

BONVICINO, C.R; LINDBERGH, S. M; e MAROJA, L. S. 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**, São Carlos, v. 62, n. 4, p. 765-774, 2002.

BRANDÃO, M; CARVALHO, P. G. S; BARUQUI, F. M. Veredas: uma abordagem integrada. **Daphne**, Belo Horizonte, v. 1, n. 3, p. 5-8, 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Aspectos epidemiológicos da infecção e da patogenicidade por hantavírus no Brasil (2004). **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. Brasília, DF, n. 3, p. 1-5, 15 nov. 2005. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/svs>>. Acesso em 25 jul. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2009, 816 p.

CALISHER, C. H. et al. Demographic factors associated with prevalence of antibody to Sin Nombre virus in deer mice in the western United States. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 43, n. 1, p. 1–11, 2007.

CAMPOS GM. **Estudo clínico-epidemiológico sobre a hantavirose na região de Ribeirão Preto, SP**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2002.

CANTONI, G. et al. Seasonal variation in prevalence of antibody to hantaviruses in rodents from southern Argentina. *Tropical Medicine and International Health*, Oxford, v. 6, p. 811-816, 2001.

CHILDS, J. E. et al. Effects of hantaviral infection on survival, growth and fertility in wild rat (*Rattus norvegicus*) populations of Baltimore, Maryland. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 25, n. 4, p. 469–476, 1989.

COSTA, L. P et al. Conservação de mamíferos no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p.103-112, 2005.

DEAN, A. G. et al. **Epi Info: a database and statistics program for public health professionals. Versão 3.3.2**. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2005. 1 CD-ROM.

DEKONENKO, A. et al. Genetic similarity of Puumala viruses found in Finland and western Siberia and of the mitochondrial DNA of their rodent hosts suggests a common evolutionary origin. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 3, n. 4, p. 245-57, 2003.

DOUGLASS, R. J. et al. Sin Nombre virus infection of deer mice in Montana: characteristics of newly infected mice, incidence, and temporal pattern of infection. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 43, n. 1, p. 12–22, 2007.

EDGAR, R. C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.32, p.1792-1797, 2004.

ENGELTHALER, D. M. et al. Climatic and environmental patterns associated with hantavirus pulmonary syndrome, Four Corners region, United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 1, p. 87-94, 1999.

FERREIRA M. S. Hantavíruses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, p. 81-96, 2003.

FERRES, M. et al. Prospective evaluation of household contacts of persons with hantavirus cardiopulmonary syndrome in Chile. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 195, p. 1563–1571, 2007.

FIGUEIREDO, L. T. M. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on Araraquara virus recombinant nucleocapsid protein. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence, v. 81, p. 273–276, 2009.

FIGUEIREDO, L. T. M. et al. Hantavirus Pulmonary Syndrome, Central Plateau, Southeastern, and Southern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, n. 4, p. 561–7, 2009.

FIGUEIREDO, L. T. M. et al.. Expression of a hantavirus N protein and its efficacy as antigen in immune assays. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 41, p. 596–599, 2008

GAVRILOVSKAYA, I. et al. The Role of the Endothelium in HPS Pathogenesis and Potential Therapeutic Approaches. **Advances in Virology**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

GAVRILOVSKAYA, I. N. et al. $\beta 3$ integrins mediate the cellular entry of Hantaviruses that cause respiratory failure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 12, p. 7074-7079, 1998.

GITHEKO, A. K.; LINDSAY, S. W.; CONFALONIERI, U. E.; PATZ, J. A, Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. **Bulletin of World Health Organization**, Genebra, v. 78, n. 9, p., 1136-1147, 2000.

GONZALEZ, D. V. et al. Andes virus associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Argentina and determination of the precise site of infection. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Lawrence, v. 66, p. 713–720, 2002.

GOUY, M; GUINDON, S; GASCUEL, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.27, p.221-224, 2010.

GUO, W. et al. Phylogeny and Origins of Hantaviruses Harbored by Bats, Insectivores, and Rodents. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 2, e1003159, 2013.

HENRIQUES, R. P. B; BIZZERRIL, M. X. A; KOHLSDORF T. Abundância riqueza e seleção de hábitat de pequenos mamíferos dos cerrados do Brasil central. In: Leite, L. L; Saito, C. H. (Eds). **Contribuição ao conhecimento ecológico do Cerrado**. Brasília: Universidade de Brasília, 1997, p. 127-130.

JONSSON, C. B. et al. Potential importance of error catastrophe to the development of antiviral strategies for Hantaviruses. **Virus Research**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 195-205, 2005.

JONSSON, C. B; FIGUEIREDO, L. T M; VAPALAHTI O. A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 23, n. 2, p. 412-441, 2010.

JUNG, Y. T; KIM, G. R. Genomic characterization of M and S RNA segments of hantaviruses isolated from bats. **Acta virologica**, Bratislava, v. 39, n. 4, p. 231-233, 1995.

KANG, H. J. et al. Shared Ancestry between a Newfound Mole-Borne Hantavirus and Hantaviruses Harbored by Cricetid Rodents. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 85, p. 7496-7503, 2011.

KHAIBOULLINA, S. F. et al. Andes-virus-induced cytokine storm is partially suppressed by ribavirin. **Antiviral Therapy**, Londres. No prelo. 2013.

KIM, G.. R; LEE, Y. T; PARK, C. H. A new natural reservoir of hantavirus: isolation of hantaviruses from lung tissues of bats. **Archives of Virology**, Nova York, v. 134, n.1-2, p.85-95, 1994.

KUENZI, A. J. et al. Long-term dynamics of Sin Nombre viral RNA and antibody in deer mice in Montana. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 41, n. 3, p. 473–481, 2005.

LAVOCAT, M. et al. Caracterização clínica e epidemiológica dos casos confirmados de hantavirose com local provável de infecção no bioma Cerrado Brasileiro, 1996 a 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 537-545, 2011.

LEDUC, J. W. et al. 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**, Lawrence, v.34, p. 810-815, 1985.

LEE, H. W; LEE, P. W; JOHNSON, K. M. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.137, n. 3, p. 298–308, 1978.

LE MOS, E. R. S; SILVA, M. V. 2005. Hantavírus. In:J. R. Coura. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: 1845-1853.

LIMONGI, J. E et al. Serological survey of hantavirus in rodents in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 2013. In press.

LIMONGI, J. E. **Estudo clínico-epidemiológico da síndrome cardiopulmonar por hantavírus na região de Uberlândia-MG, 2006**. 2007. 118 f. Dissertação (em Imunologia e Parasitologia Aplicadas)- – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2007b.

LIMONGI, J. E. et al. Cross-sectional survey of hantavirus infection, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, n. 12, p. 1981–3, 2009.

LIMONGI, J. E. et al. Síndrome cardiopulmonar por hantavírus no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, 1998-2005: aspectos clínico-epidemiológicos de 23 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 3, p. 295-299, 2007a.

MADHAV, N. K. et al. Delayed density-dependent prevalence of Sin Nombre virus antibody in Montana deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and implications for human disease risk. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 7, n. 3, p. 353-364, 2007.

MAGALHÃES, G.M. Sobre os cerrados de Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 38, p. 59-70, 1966. Suplemento.

MARINHO-FILHO, J. et al. Diversity standards and small mammal numbers: conservation of the cerrado biodiversity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 66, p.149-156, 1994.

MEERBURG, B. G; SINGLETON, G. R; KIJLSTRA, A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 35, n. 3, p. 221-270, 2009.

MERINO, A. C. et al. Primer caso de síndrome cardiopulmonar por Hantavírus secundario a mordedura de ratón. **Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias**, Santiago, v. 18, n. 3, p. 199-205, 2002.

MERTZ, G. J. *Bunyaviridae*: Bunyaviruses, Phleboviruses, Nairoviruses and Hantaviruses. In: RICHMAN, D. D.; WHITLEY, R. J.; HAYDEN, F. G.(Ed.). **Clinical virology**. 2 ed. Washington: ASM Press, 2002, cap. 42, p. 921-947.

MILLS, J. N, et al. Methods for Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 1995.

MILLS, J. N. et al. Patterns of association with host and habitat: antibody reactive with Sin Nombre vírus in small mammals in the major biotic communities of the Southeastern United

States. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Lawrence, v. 56, n. 3, p. 273-284, 1997.

MILLS, J. N.; CHILDS, J. E. Ecologic Studies of Rodent Reservoirs: Their Relevance for Human Health. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 4, p. 529–537, 1998.

MILLS, J. N. et al. A longitudinal study of hantavirus infection in three sympatric reservoir species in agroecosystems on the Argentine Pampa. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 7, n. 2, p. 229-240, 2007.

MINO, M. H. et al. Seasonal abundance and distribution among habitats of small rodents on poultry farms A contribution for their control. **International Journal of Pest Management**, London, v. 53, n. 4, p. 311-316, 2007.

MOHR, K.; LEIRS, H.; KATAKWEBA, A.; MACHANG’U, R. Monitoring rodents movements with a biomarker around introduction and feeding foci in an urban environment in Tanzania, **African Zoology**, v. 42, n. 2, p. 294-98, 2007.

MORZUNOV, S. P. et al. Genetic analysis of the diversity and origin of hantaviruses in *Peromyscus leucopus* mice in North America. **Journal of Virology**, Baltimore, v.72, p. 57–64, 1998.

MOU, D. L. et al. Cellular entry of Hantaan virus A9 strain: specific interactions with beta3 integrins and a novel 70kDa protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 339, n. 2, p. 611–617, 2006.

MUSSER, G. G; CARLETON, M. D. Family Cricetidae. In: Wilson DE, Reeder DM, editors. **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**, 3rd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. p. 955–1189.

NICHOL, S. T. et al. Family *Bunyaviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, (Ed.). **Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego (CA): Elsevier Academic Press, 2005, p. 695–716.

OLIVEIRA, J. A; BONVICINO, C. R. Ordem Rodentia. In: REIS, N. R. et al. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2006. cap. 12, p. 347-406.

OLIVEIRA, R. C. et al. 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, v. 11, n. 3, p. 301-314, 2011.

PADULA, P. et al. Pathogenic hantaviruses, northeastern Argentina and eastern Paraguay. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 13, p. 1211–1214, 2007.

PADULA, P. J. et al. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. **Journal of Medical Microbiology**, Londres, v. 49, p.149-155, 2000.

PADULA, P. J. et al. Epidemic outbreak of Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. Molecular evidence of person to person transmission of Andes virus. **Medicina (B Aires)**, Buenos Aires, v.58, p. 27-36, 1998.

PEARCE-DUVET J. M. et al. Changes in sin nombre virus antibody prevalence in deer mice across seasons: the interaction between habitat, sex, and infection in deer mice. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 42, n. 4, p. 819–824, 2006.

PLYUSNIN, A. et al. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 68, p.7833–7839, 1994.

PLYUSNIN, A.; MORZUNOV, S. P. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlim, v. 256, p. 47–75, 2001.

RABONI, S. M. et al. Clinical survey of hantavirus in southern Brazil and the development of specific molecular diagnosis tools. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence, v. 72, n. 6, p. 800-804, 2005.

RAMSDEN, C; HOLMES, E. C; CHARLESTON, M. A. Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.26, p.143-153, 2009.

RIBEIRO, J. F; WALTER, B. M. T. **As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado**. In.: SANO, S. M; ALMEIDA, S. P; RIBEIRO, J. F. **Ecologia e flora**. Brasília: EMBRAPA, 2008. v. 1, p. 152-212.

RIVERA, E. A.; AMARAL, M. H.; NASCIMENTO, V. P. **Ética e Bioética Aplicadas à Medicina Veterinária**. Goiânia: Editora UFG, 2006. 299p.

RONQUIST, F; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v.19, p.1572-1574, 2003.

ROSA, E. S. T. et al. Hantaviruses and Hantavirus Pulmonary Syndrome, Maranhão, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 16, n. 12, p. 1952–55, 2010.

ROSA, E. S. T. et al. Newly recognized hantaviruses associated with Hantavírus pulmonary syndrome in northern Brazil: Partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 5, n. 1, p. 11-19, 2005.

SANTOS, E. D; GARRETT, D. O. Evaluation of the hantavirus surveillance in Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 15-31, 2005.

SCHMALJOHN, C. Molecular biology of hantaviruses. In: R. M. Elliot (ed.), **The Bunyaviridae**. Plenum Press, New York, NY, 1996, p. 63–90.

SCHMALJOHN, C. S; HOOPER, J. W. *Bunyaviridae*: The viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. 4ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. cap. 48, p. 1581-1602.

SIBOLD, C. et al. Dobrava hantavirus causes hemorrhagic fever with renal syndrome in central Europe and is carried by two different Apodemus mice species. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 63, n. 2, p.158-167, 2001.

SILVA, A. G. **Inferência Filogenética do Segmento Genômico S Completo dos Hantavírus Identificados no Brasil**. 2012. 131 f. Dissertação (Ciências em modelagem computacional)- Laboratório nacional de computação científica, Petrópolis, RJ, 2012.

- SONG, J. W. et al. In vivo characterization of the integrin beta3 as a receptor for Hantaan virus cellular entry. **Experimental and molecular medicine**, v. 37, n. 2, p. 121–127, 2005.
- STREILEN, K. E. **Ecology of small mammals in the Semiarid Brazilian Caatinga I.** Climate and faunal composition. Andrew Carnegie Museum.v. 51, p. 79–107, 1982.
- SUÁREZ, O. V. et al. Prevalence of Infection with Hantavirus in Rodent Populations of Central Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 727-732, 2003.
- SUMIBCAY, L. et al. Divergent lineage of a novel hantavirus in the banana pipistrelle (*Neoromicia nanus*) in Cote d'Ivoire. **Virology Journal**, v. 9, p.34, 2012.
- SUZUKI, A. et al. Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 12, p. 2127–34, 2004.
- TAMURA, K.. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.
- TELFER, S.; BOWN, K. J.; SEKULES, R.; BEGON, M.; HAYDEN, T.; BIRTLES, R. Disruption of a host-parasite system following the introduction of an exotic host species, **Parasitology**, Cambridge, v. 130, n. 6, p. 661-68, 2005.
- TRAVASSOS DA ROSA , E. S. et al. Pygmy rice rat as potential host of Castelo dos Sonhos Hantavirus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.17, n. 8, p. 1527-1530, 2011.
- TRAVASSOS DA ROSA, E. S. et al. Hantaviruses and hantavirus pulmonary syndrome, Maranhao, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.16, n. 12, p. 1952-1955, 2010.
- TRAVASSOS DA ROSA, E. S. et al. Molecular epidemiology of Laguna Negra virus, Mato Grosso State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.18, n. 6, p. 982-985, 2012
- VERITY, R. et al. Hantavirus pulmonary syndrome in Northern Alberta, Canada: clinical and laboratory findings for 19 cases. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 31, p. 942-946, 2000.

VIEIRA, E. M; PALMA, A. R. T. Pequenos mamíferos de Cerrado: distribuição dos gêneros, estrutura das comunidades nos diferentes habitats. In: SCARIOT, A; FELFILI, J. M; SOUSA-SILVA, J. C. (Orgs). **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 265- 282.

WEISS, S. et al. Hantavirus in bat, Sierra Leone. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 18, p.159-161, 2012.

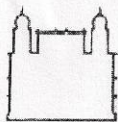
WELLS, R. M. et al. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.3, p.171-174, 1997.

YOUNG, J. C. et al. The incubation period of hantavirus pulmonary syndrome. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Lawrence, v. 62, n. 6, p. 714-717, 2000.

ZAKI, S. R. et al. Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 146, n. 3, p. 552-579, 1995.

9. Anexos

Anexo – A. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa-FIOCRUZ



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 28 de abril de 2011.

Carta: 012/11

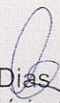
De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos e
- Dr. Christian Gabriel Niel

Prezados Senhores,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **559/10** intitulado “**Projeto de Pesquisa Associado às atividades de referência do laboratório de Hantavírus e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ**” com a deliberação de **APROVADO**.

Atenciosamente


Carla Dias Netto
Secretária Geral
CEP/Fiocruz

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705
Manguinhos - RJ. - CEP.: 21.040-360
Tels.: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815
e-mail: etica@fiocruz.br

Anexo – B. Ficha de coleta de dados dos roedores capturados.

Nº LBCE : 17276 **TAG:** _____ **Espécie:** Calomys

Sexo: Macho () Fêmea (X) **Data de captura:** 11/12/2012

PROCEDÊNCIA:

Estado: MG **Município:** Uberlândia **Localidade (fragmento):** Faz. GLORIA

Trilha: FG **Ponto:** 24 **Armadilha:** S.H

AMOSTRAS

Coleta de sangue: sim (X) não ()

Hemocultivo: sim () nº de tubos: _____ não (X) **Exame a fresco:** sim () não (X)

Soro: sim (X) não () Eppendorf () Eluató () **Microhematócrito:** _____

Cariótipo: sim (X) nº de tubos: 01 não () Responsável: Neto

Coleta para Hantavirus: rim (X) pulmão (X) fígado (X) baço (X) coração (X)

Banco genético: Fígado (X) baço (X) **Ectoparasitas:** sim (X) não ()

Endoparasitas: sim (X) não () Responsável: _____

Perfusão: sim () não (X) **Esfregaço:** sim () não (X) nº de lâminas: _____

CONDIÇÃO REPRODUTIVA / OUTRAS INFORMAÇÕES

Vagina: aberta (X) fechada ()

Secreção: sim () não (X) Tipo: _____

Grávida: Sim (X) Não () **Lactante:** Sim (X) Não ()

Útero: virgem () não virgem: (X)

Embriões/Filhotes nº: 03 **Tamanho do embrião:** 1 cm

Escrotado: () **Não escrotado:** ()

Ectoparasitas: sim (X) não () **Vesícula:** sim () não (X)

Cicatriz: Orelha: Sim (X) Não () / Cauda: Sim () Não (X)

MARSUPIAIS

Filhotes de marsupiais: nº _____ Hb _____ TA _____

Características: _____

Manchas: sim () não ()

Bolsa: virgem () não virgem () **Tetas:** _____

Dentição (sup./inf.): _____ / _____

MEDIDAS (em mm) / COLEÇÃO

Peso: 39 **Comp. Corpo:** 80 **Cauda:** 69 **Orelha:** 15

Pé: c/ unha: 15 **s/ unha:** 14

Pele: Taxidermizado () Aberta () em álcool ()

Meio líquido: c/ pele () s/ pele ()

OBSERVAÇÕES:

Pulmões para Microscopia Eletrônica

Anexo – C. Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais-UFU



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 185/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 071/11

Projeto Pesquisa: “Caracterização de agentes zoonóticos em roedores sigmodontíneos, com ênfase em hantavírus e Rickettsia spp no Triângulo Mineiro, Minas Gerais”.

Pesquisador Responsável: Matias Pablo Juan Szabó

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 11 de novembro de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU

Anexo – D. Licença permanente para coleta de material zoológico e registros das quatro expedições realizadas.



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 13373-1	Data da Emissão: 19/11/2007 17:02
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 608054	Nome: PAULO SÉRGIO D'ANDREA	CPF: 062.639.198-92
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas;
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NAO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.
14	As atividades contempladas nesta autorização NAO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Rodentia, Didelphimorphia
2		

Destino do material biológico coletado

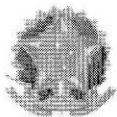
#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Museu Nacional (UFRJ)	coleção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 91827146



Página 1/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Registro de Expedição
Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 3952-1	Data da emissão: 05/12/2011 17:49
Número da solicitação: 13373	Data da expedição: 06/12/2011 à 12/12/2011

Dados do titular

Nº de Registro: 608054	Nome: PAULO SÉRGIO D ANDREA	CPF: 062.639.198-92
Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0001-35	

Equipe

#	Nome	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade	*Responsável
1	PAULO SÉRGIO D ANDREA	062.639.198-92	16921152 SSP-SP-SP	Brasileira	Sim
2	FABIANO ARAUJO FERNANDES	076.039.387-75	08479632-5 Detran-RJ	Brasileira	Não
3	Socrates Fraga da Costa Neto	098.931.347-65	126332089 IFP-RJ	Brasileira	Não

* O titular será o responsável pela equipe caso não designe alguém para exercer tal função.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Localidade	UF	Município
1	Uberlândia	MG	UBERLANDIA

Táxons autorizados

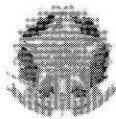
Táxon(s)	
Outros mamíferos	Rodentia, Didelphimorphia

Este documento foi expedido pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO de acordo com a Instrução Normativa Ibama número 154/07. Qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 59949216



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Registro de Expedição
Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 4210-1	Data da emissão: 16/03/2012 18:35
Número da solicitação: 13373	Data da expedição: 19/03/2012 à 27/03/2012

Dados do titular

Nº de Registro: 608054	Nome: PAULO SÉRGIO D ANDREA	CPF: 062.639.198-92
Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35

Equipe

#	Nome	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade	*Responsável
1	PAULO SÉRGIO D ANDREA	062.639.198-92	16921152 SSP-SP-SP	Brasileira	Sim
2	Socrates Fraga da Costa Neto	098.931.347-65	126332089 IFP-RJ	Brasileira	Não
3	Alexandro Guterres da Silva	086.935.197-43	111221149 DETRAN-RJ	Brasileira	Não

* O titular será o responsável pela equipe caso não designe alguém para exercer tal função.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Localidade	UF	Município
1	Uberlândia	MG	UBERLANDIA

Táxons autorizados

Táxon(s)
Outros mamíferos Rodentia, Didelphimorphia

Este documento foi expedido pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO de acordo com a Instrução Normativa Ibama número 154/07. Qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 64916391



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Registro de Expedição
Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 4550-1	Data da emissão: 19/07/2012 13:18
Número da solicitação: 13373	Data da expedição: 01/08/2012 à 08/08/2012

Dados do titular

Nº de Registro: 608054	Nome: PAULO SÉRGIO D ANDREA	CPF: 062.639.198-92
Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0001-35	

Equipe

#	Nome	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade	*Responsável
1	Socrates Fraga da Costa Neto	098.931.347-65	126332089 IFP-RJ	Brasileira	Sim
2	Alexandro Guterres da Silva	086.935.197-43	111221149 DETRAN-RJ	Brasileira	Não

* O titular será o responsável pela equipe caso não designe alguém para exercer tal função.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Localidade	UF	Município
1	Município de Uberlândia	MG	UBERLÂNDIA

Táxons autorizados

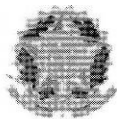
Táxon(s)	
Outros mamíferos	Rodentia, Didelphimorphia

Este documento foi expedido pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO de acordo com a Instrução Normativa Ibama número 154/07. Qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 81678933



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Registro de Expedição
Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 4875-1	Data da emissão: 06/11/2012 11:27
Número da solicitação: 13373	Data da expedição: 13/11/2012 à 18/11/2012

Dados do titular

Nº de Registro: 608054	Nome: PAULO SÉRGIO D ANDREA	CPF: 062.639.198-92
Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35

Equipe

#	Nome	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade	*Responsável
1	Alexandro Guterres da Silva	086.935.197-43	111221149 DETRAN-RJ	Brasileira	Não
2	Socrates Fraga da Costa Neto	098.931.347-65	126332089 IFP-RJ	Brasileira	Sim

* O titular será o responsável pela equipe caso não designe alguém para exercer tal função.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Localidade	UF	Município
1	Município de Uberlândia	MG	UBERLÂNDIA

Táxons autorizados

Táxon(s)
Outros mamíferos Rodentia, Didelphimorphia

Este documento foi expedido pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO de acordo com a Instrução Normativa Ibama número 154/07. Qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 43133213



Página 1/3