

***Estudo sobre o ciclo silvestre da hantavirose
no Estado do Paraná e no Estado do Rio de Janeiro:
Avaliação do potencial de roedores silvestres como
reservatórios, em áreas com e sem casos humanos da
Síndrome Cardio-Pulmonar por Hantavírus***

Dr. Paulo Sérgio D'Andrea
Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

Setembro, 2007

INTRODUÇÃO

O contínuo processo de interiorização das atividades humanas, associado ao desmatamento e fragmentação da paisagem, tem provocado grandes mudanças nos habitats naturais, afetando diretamente a estrutura das comunidades e demografia de animais e plantas (Soulé & Wilcox, 1980; Pardini et al., 2005; Pires et al., 2006). Tais perturbações na demografia das populações naturais, principalmente nas áreas de interface entre ambientes peri-urbanos/rurais e ambientes silvestres, têm alterado os padrões de diversidade e abundância das espécies, que por sua vez influenciam na dinâmica natural de transmissão de ciclos silvestres de parasitas (Kruse et al., 2004). Mills (2006) aponta para a relação do fenômeno da perda da biodiversidade e a emergência de doenças infecciosas. Nestas situações, em habitats alterados, poucas espécies de animais (generalistas/oportunistas) seriam favorecidas, possibilitando o incremento de suas densidades. Se estas espécies favorecidas forem as mais competentes para a transmissão do patógeno, no caso hantavirus, haverá uma facilitação e maior eficiência da transmissão, aumentando as taxas de prevalência entre as espécies de reservatórios e por consequência maior risco de transmissão a seres humanos (processo oposto ao conhecido como “dilution effect”, Schmidt & Ostfeld, 2001). Os processos de emergência de novas doenças ou recrudescimento de outras já controladas (re-emergência), principalmente de origem zoonótica (Daszak et al., 2000; Sutherst et al., 2001), está em sua grande maioria relacionada a mamíferos silvestres (Mills & Childs, 1998). Nesse cenário, a hantavirose, uma típica zoonose “rodent-borne” causada por RNA vírus (Bunyaviridae, Hantavirus), apresenta-se como uma das principais doenças emergentes da atualidade no Brasil devido a sua alta taxa de mortalidade, crescente ocorrência em praticamente todo o território nacional e ausência de medicação específica.

Os Hantavírus têm sido reconhecidos como agentes etiológicos de febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR) desde a década de 50, na Ásia e Europa (Lee et al., 1978; Ruo, 1994). Nas Américas, a infecção em seres humanos por hantavírus só foi reconhecida em 1993, em um surto de casos humanos nos Estados Unidos (Nichol, 1993), e ainda, no Brasil durante o mesmo ano, em casos humanos no interior de São Paulo (Silva, 1997), Entretanto, diferente do Velho Mundo, a hantavirose das Américas apresenta-se como uma

síndrome febril com complicações cardio-pulmonares (SCPH). No Brasil, desde os primeiros registros em 1993, mais de 900 casos humanos foram confirmados pelo ministério da saúde, com ampla distribuição entre a maioria dos estados brasileiros e alta taxa de letalidade (365 óbitos - Informe Técnico do Ministério da Saúde, dados não publicados): Santa Catarina (178), Minas Gerais (183), Paraná (163), Mato Grosso (109), São Paulo (105), Rio Grande do Sul (58), Distrito Federal (53), Pará (32), Goiás (25), Maranhão (9), Amazonas (4), Rio Grande do Norte (2), Rondônia (2) e Bahia (1).

No estado do Rio de Janeiro, apesar de evidências sorológicas em humanos (Lamas, 2006) e confirmação de circulação de hantavírus patogênico entre roedores silvestres (Pereira *et al.*, 2005), nenhum caso clínico humano de hantavirose foi até o momento notificado (Dados não publicados SVS/MS). O estado do Paraná, por sua vez possui 163 casos humanos registrados de hantavirose, com letalidade de 33,7% (55 óbitos) (Informe Técnico Periódico – SVS/Ministério da Saúde), distribuídos entre as diversas regiões do estado, além da confirmação da circulação de hantavírus entre roedores silvestres (Suzuki *et al.* 2004; Raboni *et al.* 2005).

As hantavirose são zoonoses associadas a roedores silvestres e sinantrópicos, e segundo descobertas recentes a insectívoros mussaranhos (Song, 2007). Nas Américas, os hantavirus causadores da SCPH estão, até o momento, associados exclusivamente a roedores da subfamília Sigmodontinae (Cricetidae) e apresentando uma especificidade entre a variante viral e a espécie de roedor. Esta associação estrita reforça a necessidade de se realizar uma identificação taxonômica correta e inequívoca das espécies de roedores consideradas reservatórios. A alta especificidade é considerada decorrente de longa história co-evolutiva entre este grupo de roedores e os hantavírus (Plyusnin *et al.* 1996, Spiropoulou *et al.* 1994). Dessa forma, diversos hantavirus, amplamente distribuídos na América do Sul e muitos comprovadamente causadores da hantavirose humana, tem sido descritos associados a diferentes sigmodontíneos: no Paraguai - *Calomys laucha* X Laguna Negra vírus (Yahnke *et al.* 2001); na Argentina *Oligoryzomys longicaudatus* X Andes vírus, *O. flavescens* X And Cent Lec vírus e *Akodon azare* Pergamino vírus (Padula *et al.* 2002, González della Valle *et al.* 2002, Suárez *et al.* 2003); no Peru e Bolívia *Oligoryzomys microtis* X vírus Rio Mamoré (Bharadwaj, 1997), entre muitos outros.

No Brasil até a presente data, seis genótipos de hantavírus foram descritos: 1) caracterizados a partir de roedores e pacientes - Juquitiba (JUQ) associado a *Oligoryzomys nigripes* e Araraquara (ARA) associado a *Necromys (=Bolomys) lasiurus*; (Romano-Lieber *et al.* 2001; Suzuki *et al.*, 2004); 2) caracterizados somente a partir de roedores, e portanto, sem papel conhecido na epidemiologia da hantavirose humana - Rio Mearim (RM) associado a *Holochilus sciureus*, Anajatuba (ANAJ) associado a *Oligoryzomys fornesi* (Romano-Lieber *et al.* 2001; Suzuki *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2005) e Jabora (JAB) associado a *Akodon montensis* (Oliveira *et al.*, 2007); 3) caracterizados a partir de pacientes humanos, porém sem reservatório roedor conhecido até o momento - Castelo dos Sonhos (CAS), associados a casos humanos no Pará e no Mato Grosso (Johnson *et al.* 1999) e Araucária, considerado um vírus “Juquitiba-like”, e associado a casos humanos no Paraná (Raboni *et al.* 2005). Evidências sorológicas, porém sem detecção e caracterização molecular, foram também encontradas em *Calomys tener* e em *Oxymycterus rutilans* (Suzuki *et al.* 2004).

Estudos em campo e laboratório mostraram que os roedores infectados com hantavírus são reservatórios estáveis, mantendo infecção por toda sua vida, e aparentemente, sem comprometimento de seu “fitness” geral. A transmissão dos hantavírus para os seres humanos ocorre, principalmente, de maneira acidental pela inalação de aerossóis contaminados provenientes das fezes e urina dos roedores infectados. Outras vias de infecção menos frequentes são através de mordeduras de roedores infectados, além da infecção por contato pessoa-pessoa pelo vírus Andes, também bem documentada na Argentina (Lee *et al.* 1981, Le Duc 1987, Padula *et al.* 1998, Meyer and Schmaljohn 2000, Martinez *et al.* 2005, Ferres *et al.* 2007). Os surtos desta virose no Brasil têm sido frequentemente relacionados a períodos de altas populacionais de roedores silvestres em áreas agrícolas e peri-domiciliares rurais (Pereira 1999, Figueiredo *et al.* 2001).

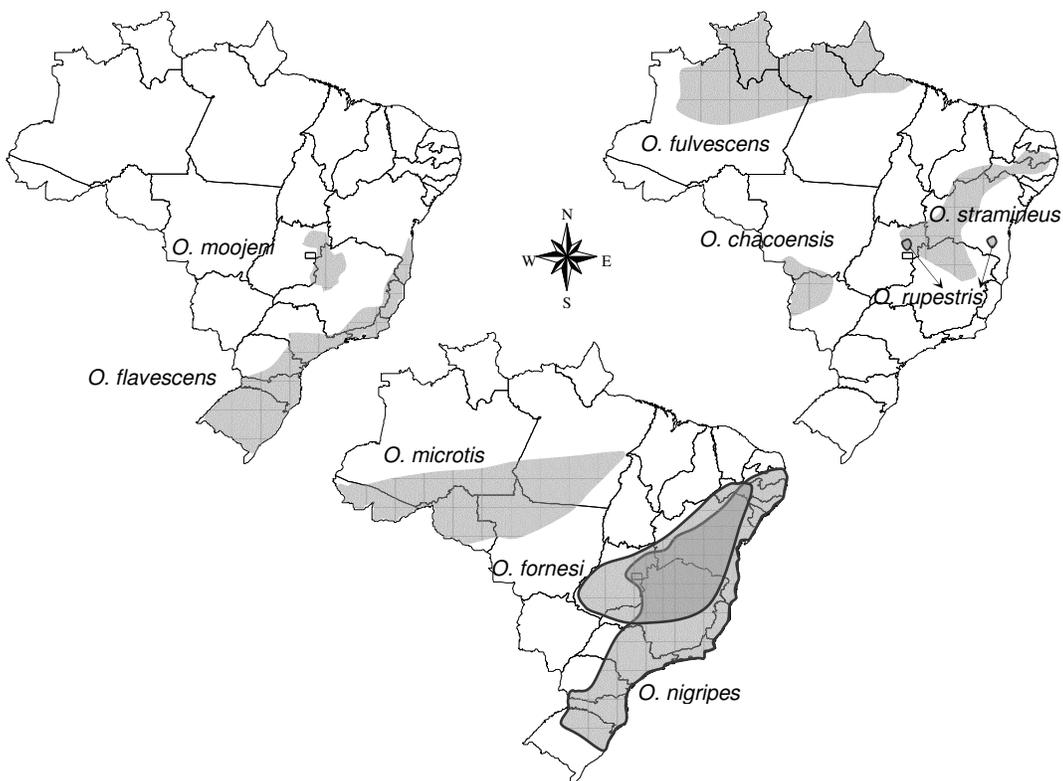
Oligoryzomys nigripes X hantavírus

No Brasil, existem pelo menos oito espécies pertencentes ao gênero *Oligoryzomys*, com representantes em praticamente todos os biomas brasileiros: *O. nigripes*, *O. flavescens*, *O. fornesi*, *O. microtis*, *O. stramineus*, *O. chacoensis*, *O. rupestris*, *O. moojeni* (Lima *et al.*,

2003; Weksler e Bonvicino, 2005) (Fig. 01). Espécimes deste gênero com sorologia positiva para hantavírus foram encontrados em diversas áreas: *O. nigripes* em quatro áreas endêmicas (São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), bem como em áreas sem ocorrência de casos humanos (Rio de Janeiro e Espírito Santo); *O. fornesi* no estado do Maranhão e *O. microtis* no estado de Mato Grosso (Romano-Lieber *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2004).

A espécie *O. nigripes* habita florestas primárias e secundárias na Mata Atlântica, incluindo as Florestas de Araucária, de Pernambuco ao Rio Grande do Sul, ocorrendo também ao sul do Cerrado nos estados de São Paulo, Minas Gerais e no Distrito Federal. *O. nigripes*, que é associado a variante viral Juquitiba-like (JUQ-like), é a única espécie reconhecida como reservatório de casos humanos de hantavirose no bioma Mata Atlântica. Assim como outras espécies de *Oligoryzomys*, *O. nigripes* é uma das primeiras espécies oportunistas a se instalar em áreas agrícolas e de interface silvestre/alterada, e em instalações rurais e peri-domiciliares.

Apesar da vasta distribuição geográfica do *O. nigripes*, e da detecção de circulação silvestre do hantavírus associado em grande parte dessa distribuição, o perfil epidemiológico da hantavirose neste cenário (Mata Atlântica) é bastante complexo e variado, observando-se, por exemplo, em algumas regiões, ausência de casos humanos de hantavirose apesar da ocorrência do reservatório e do hantavírus patogênico associado. Dessa maneira, o entendimento da variação regional na abundância, distribuição espacial e possíveis variações genéticas intra-específicas podem ser determinantes para explicar essa complexidade do perfil epidemiológico.



Distribuição das espécies de *Oligoryzomys* no Brasil.

JUSTIFICATIVA

A hantavirose é uma doença emergente de crescente ocorrência no território nacional, e ainda pouco investigada. No Brasil, com exceção dos esforços do Ministério da Saúde (SVS) e de algumas secretarias estaduais de saúde em áreas de ocorrência de casos humanos, poucos grupos de pesquisa vêm realizando estudos mastozoológicos que investigam a participação dos roedores na transmissão do hantavirus, ou mesmo, outras zoonoses.

No estado do Rio de Janeiro, esforços do nosso grupo demonstraram evidencia sorológica e molecular da circulação de hantavírus patogênico em roedores da espécie *Oligoryzomys nigripes* no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (Pereira *et al.*, 2005) e evidência sorológica em humanos no município do Rio de Janeiro, região de Jacarepaguá (Lamas, 2006). Ainda, para o estado do Rio de Janeiro, Silva *et al.* (2005), encontraram

evidência sorológica da presença de hantavírus em roedores silvestres coletados pelo Serviço de Controle da Peste na Serra dos Órgãos. Entretanto, apesar da ausência de casos clínicos da doença no estado do Rio de Janeiro, por ser uma doença emergente e pelas evidências inequívocas da circulação de hantavírus observadas até o momento, é fundamental uma vigilância constante também nessas áreas de não ocorrência.

No estado do Paraná, além dos casos humanos de hantavirose, foram registradas evidências da circulação de hantavírus entre roedores silvestres dos gêneros *Oligoryzomys*, *Akodon*, *Thaptomys* e *Oxymycterus* (Informe Técnico Periódico - SVS/Ministério da Saúde). Nosso grupo já realizou uma expedição piloto para a região de General Carneiro/PR, aonde foi encontrada evidência sorológica em 02 *Akodon montensis* e 01 *Oxymycterus* gr. *Judex*.

Os dados gerados nesse projeto irão fornecer importantes informações não só para estudos epidemiológicos sobre a transmissão de hantavirose nos estados do Paraná e Rio de Janeiro, como também para estudos taxonômicos e ecológicos de pequenos mamíferos dessas regiões.

Uma das principais particularidades dos trabalhos realizados por nosso grupo é a interdisciplinaridade dos projetos integrando áreas como a ecologia, zoologia, genética, parasitologia e epidemiologia, proporcionando uma melhor compreensão do fenômeno parasitismo do hantavírus em seus reservatórios e dos processos de emergência da hantavirose. Nesse sentido, além dos diversos especialistas de nosso laboratório (Dr. Luis Rey, Dra. Rosana Gentile e Dr. Cláudio Bidau), contamos com forte cooperação com a Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos, do Laboratório de Referência Regional de Hantavirose e Nacional de Rickettsioses, com o Dr. Hermann Schatzmayr do Laboratório de Flavivírus (do Instituto Oswaldo Cruz), com a Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino, do Instituto Nacional do Câncer, nos estudos taxonômicos e de sistemática dos roedores, e com a Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos, do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP/FIOCRUZ). Essas cooperações traduzem-se em coordenação conjunta de projetos, aquisição e utilização compartilhada de equipamentos e materiais, e orientação conjunta de alunos. Outra cooperação importante é com o Programa de Vigilância Eco-epidemiológica de Hantavírus da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), Ministério da Saúde, na execução dos trabalhos de campo e na identificação taxonômica dos roedores reservatórios, que tem nos

possibilitado o estudo de importante e abundante material zoológico de diversas regiões do Brasil, onde se constata casos humanos de hantavirose. Os dados gerados nesse projeto irão integrar a base de dados que vem sendo acumulada em nível nacional e irá fornecer importantes informações não só para estudos taxonômicos e ecológicos de pequenos mamíferos, como também para estudos epidemiológicos sobre a transmissão de hantavirose.

Outro aspecto importante, é que apesar dos muitos estudos realizados com os pequenos mamíferos, com as mais distintas abordagens, a diversidade de espécies deste grupo não é ainda completamente conhecida e a sua sistemática apresenta-se bastante confusa. A utilização neste projeto de técnicas citogenéticas (cariotipagem) integradas a estudos morfológicos na identificação em nível específico dos roedores vai possibilitar o esclarecimento de problemas taxonômicos, principalmente por permitirem reconhecer espécies morfológicamente semelhantes.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Realizar um estudo comparativo do papel dos roedores sigmodontíneos como potenciais reservatórios de hantavírus em uma região com ocorrência de casos humanos da hantavirose (estado do Paraná) e em uma região sem ocorrência de casos humanos (estado do Rio de Janeiro).

Objetivos específicos

1. Caracterizar a fauna de pequenos mamíferos nas áreas de estudo.
2. Estudar comparativamente a composição e abundância relativa das espécies de pequenos mamíferos nas áreas de estudo.
3. Determinar o status da infecção por hantavírus nos roedores silvestres coletados, através de diagnóstico indireto (sorologia) e direto (RT-PCR).
4. Caracterizar as variantes virais de hantavírus em roedores sigmodontíneos.

5. Realizar uma análise filogeográfica e populacional de *Oligoryzomys nigripes*, usando como marcador o gene mitocondrial *citocromo b*, ao longo de sua distribuição nos estados do Paraná e Rio de Janeiro, visando esclarecer sua estruturação populacional, e analisar o potencial desta espécie como reservatório silvestre de Hantavírus.
7. Estabelecer uma coleção zoológica de referência de peles e esqueletos dos espécimes coletados.

METAS

- 1) Contribuir para a compreensão da dinâmica de transmissão silvestre dos hantavírus entre os roedores silvestres do Estado do Rio de Janeiro e do Estado do Paraná;
- 2) Avaliar o risco de emergência da Hantavirose no Estado do Rio de Janeiro e no Estado do Paraná considerando a estruturação das comunidades de pequenos mamíferos (riqueza de espécies e abundância) e distribuição espacial dos reservatórios potenciais, variantes virais associadas e unidades de paisagem.
- 3) Contribuir para o conhecimento sobre a fauna de pequenos mamíferos do estado do Rio de Janeiro e do Estado do Paraná e para o incremento do acervo científico da coleção zoológica de pequenos mamíferos do Museu Nacional, UFRJ e da coleção mastozoológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná;
- 4) Fomentar uma base de dados que vem sendo acumulada em nível nacional e que irá fornecer importantes informações não só para estudos taxonômicos e ecológicos de pequenos mamíferos, como também para estudos epidemiológicos sobre a transmissão de hantavirose.

ÁREAS DE ESTUDO

Serão estudadas quatro áreas no Estado do Rio de Janeiro: 1) Parque Nacional da Serra dos Órgãos e arredores, município de Teresópolis; 2) Parque Estadual da Pedra Branca, localizado na região de Jacarepaguá, município do Rio de Janeiro, 3) Município de Cordeiro e Conservatória; 4) Fragmentos florestais localizados no Reservatório de Ribeirão das Lajes, município de Piraí. Nestas áreas de trabalho no estado do Rio de Janeiro, temos

desenvolvido projetos de pesquisa sobre a fauna de pequenos mamíferos e seu parasitismo por *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi*, Poxvírus, garantindo para este projeto facilidades logísticas e operacionais, além de cooperações com secretarias municipais e outras instituições já estabelecidas. Além disto, estes projetos prévios tem possibilitado a formação de um importante banco de dados preliminar.

No estado do Paraná serão estudadas as seguintes unidades de paisagem: 1) Norte/Oeste – Floresta Estacional Semidecídua; 2) Centro/Sul – Floresta Pluvial Subtropical (Floresta de Araucária); 3) Manchas no sul e Nordeste – Savana (Campos); 4) Litoral – Floresta Tropical Pluvial Atlântica. Nestas unidades de paisagem, as áreas de estudo estão em definição, pois dependem ainda de acertos finais de cooperação com as secretarias municipais de saúde.

METODOLOGIA

Nas áreas escolhidas, serão estabelecidos 10 transectos lineares com 20 estações de captura em cada. Todos os transectos serão geo-referenciados utilizando-se um GPS, obtendo-se três coordenadas geográficas de cada (início, meio e fim). Nestas estações, serão dispostas armadilhas do tipo live-trap, modelos Tomahawk (40,64cm x 12,70cm x 12,70cm) e do tipo Sherman (7,62cm x 9,53cm x 30,48cm), apropriadas para a captura de pequenos mamíferos vivos com até 3Kg. Cada coleta terá duração de cinco dias e a isca utilizada é uma mistura composta de bacon, aveia, banana e pasta de amendoim. A periodicidade das expedições será semestral e obedecerá a estacionalidade (época seca e época chuvosa) de cada região estudada havendo, portanto, a previsão de duas expedições de coleta em cada área, por ano. A escolha dos sítios de amostragem onde serão estabelecidos os transectos levará em consideração as diversas situações eco-epidemiológicas da região, considerando-se a influência humana (tipo de atividade antrópica, épocas de plantio e colheita, etc) e a fitofisionomia.

Os transectos serão percorridos diariamente pela manhã para checagem das armadilhas quanto à presença de animais. As armadilhas contendo os animais serão transportadas, imediatamente após sua remoção dos transectos, para uma base laboratorial de campo, aonde os animais são processados e as amostras coletadas segundo normas

estritas de biossegurança, com toda a equipe paramentada com equipamentos individuais de proteção de nível 3 (filtros motorizados, máscaras com pressão positiva, e demais acessórios), e segundo normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde (FNS, 1998; Mills et al., 1995; Lemos & D'Andrea, 2006) que garantem a segurança dos membros da equipe de campo contra zoonoses de transmissão por aerossóis. Todos os membros da equipe são treinados para observar os protocolos de biossegurança no manuseio de animais silvestres preconizados pela Comissão de Biossegurança do Instituto Oswaldo Cruz, incluindo treinamento para a utilização de equipamentos de proteção individual e de proteção respiratória (EPIs Nível 3).

Na base laboratorial de campo, os animais são anestesiados com cloridato de ketamina, conforme orientação veterinária, e têm seus dados bionômicos coletados (peso corpóreo e medidas de corpo e cauda), verificados quanto ao sexo e atividade reprodutiva. A atividade reprodutiva é constatada pela ocorrência de gestação nas fêmeas de roedores (presença de embriões), e pela ocorrência de lactação nas fêmeas de marsupiais (presença de filhotes na bolsa ou pelo intumescimento das tetas indicando presença de leite e desmame recente). É também observado como indicadores de atividade reprodutiva nas fêmeas de roedores a condição externa da vagina (fechada ou aberta, e presença de secreção) e o estado de desenvolvimento do útero; e nos machos a posição dos testículos (escrotais ou abdominais). A idade dos animais é estimada nos marsupiais pelo estágio de desenvolvimento da dentição (condição do terceiro pré-molar e número de molares eclodidos), e nos roedores pelo peso corpóreo relativo.

Todos os espécimes coletados terão seu sangue coletado para o diagnóstico sorológico de infecção por hantavírus. Os animais são submetidos à coleta de sangue por punção cardíaca, com o uso de seringas de 1-3 ml de acordo com o tamanho do animal. São também coletados amostras de órgãos e vísceras dos espécimes (rim, fígado, baço, pulmão e coração), fixados em nitrogênio líquido para confirmação da infecção por hantavírus, através de diagnóstico molecular e tipagem dos vírus por sequenciamento do RNA viral, realizado em cooperação pelo Laboratório de Referência Nacional em Rickettsioses e Regional de Hantavirose, IOC, Fiocruz/RJ, sob a coordenação da Dra. Elba Regina S. Lemos.

Amostras de fígado são também fixadas e preservadas em etanol para posteriores estudos moleculares, filogenéticos e filogeográficos, dos animais. Amostras de medula óssea são obtidas para estudos citogenéticos e realização da cariotipagem dos roedores segundo técnica descrita em Bonvicino et al., 2002. A identificação taxonômica será baseada na morfologia externa, morfometria craniana e na análise cariotípica.

A eutanásia dos animais será realizada, preferencialmente, por exanguinação (sangria total) dos animais em anestesia profunda. No caso de impossibilidade de sua realização, será realizada inoculação intra-cardíaca de Cloridrato de Ketamina, numa superdosagem acima de 50 mg/Kg de peso, conforme descrito em Rivera (2006).

Todos os animais coletados serão taxidermizados e seus esqueletos preparados, para serem depositados como material testemunho na coleção científica do Museu Nacional, UFRJ. Todas as expedições de coleta estão de acordo com licença de captura para todo o território nacional (IBAMA, licença número 225/2006 – CGFAU), e licenças específicas para as unidades de conservação (IBAMA, licença número 084/2007 e IEF/RJ/PR 16/2006)

Todos os procedimentos com animais seguem protocolo experimental submetido a Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz.

Análise filogeográfica de *Oligoryzomys nigripes*

As amostras de tecidos terão o ADN isolado com técnicas apropriadas (Sambrook *et al.*, 1989). O gene mitocondrial *citocromo b* será amplificado utilizando os iniciadores L14724 (Irwin *et al.*, 1991) e MVZ 14 (Smith e Patton 1993). Os produtos serão seqüenciados em um seqüenciador automático de ADN ABI Prism™ 377 com os mesmos iniciadores e com iniciadores internos quando necessário. As seqüências serão editadas utilizando o programa "Sequence Navigator" (Applied Biosystems, Inc. 1994) e depositadas no GenBank.

Diferentes procedimentos serão realizados para minimizar os efeitos de saturação resultantes da alta taxa de substituição de nucleotídeos do ADN mitocondrial. A estimativa de divergência genética entre as seqüências (em porcentagem) será obtido pelo algoritmo de distância p com o programa "Molecular Evolution Genetics Analyses" (MEGA3; Kumar

et al., 2004). As relações entre haplótipos representativos de populações serão examinadas pelo método de máxima parcimônia através da busca heurística (adições passo-a-passo, 10 réplicas adicionadas ao acaso) com diferentes taxas de transição transversão (PAUP 4.0b; Swofford 1993) para confirmar as relações filogenéticas. As análises de máxima verossimilhança serão realizadas por busca heurística com 10 réplicas adicionadas ao acaso e com o algoritmo TBR (tree-bisection-reconnection) também obtidos com o PAUP 4.0b. Os pesos a serem utilizados se basearão nas taxas de transição transversão obtidas pelo MEGA3. Suporte para os nós das árvores obtidas será acessado por valores de Bootstrap estimados a partir de 1.000 réplicas. Para análise filogeográfica será utilizado o programa NETWORK (Bandelt *et al.*, 1999; <http://www.fluxus-engineering.com>). Esta análise será realizada apenas com os caracteres variáveis.

Diagnóstico de infecção por hantavirus

O diagnóstico para infecção por hantavírus é realizado por teste sorológico e por detecção molecular do RNA viral, sendo executado em colaboração com a Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos, do Laboratório de Hantaviruses e Rickettsioses, Departamento de Virologia e com a Dra. Cláudia N. Duarte dos Santos do Instituto de Biologia Molecular do Paraná – FIOCRUZ.

I) Sorologia: O soro obtido dos animais é submetido ao imunoenensaio enzimático (ELISA) para detecção de anticorpos anti-hantavírus da classe IgG, utilizando o antígeno Andes (Argentina), constituído pelo antígeno específico (nucleoproteína Andes recombinante) e pelo antígeno inespecífico recombinante, seguindo as recomendações do protocolo descrito por P.J. Padula do Instituto Carlos Malbran de Buenos Aires, Argentina (Padula *et al.* 2000). A Imunoglobulina anti -IgG (*Peromyscus leucopus*) produzida em cabra e o substrato para peroxidase ABTS da Kirkegaard and Perry Laboratories, Maryland (KPL) são os reagentes utilizados.

II) Diagnóstico molecular: Amostras de fígado, rim, coração, pulmão e baço são criopreservadas para análises moleculares na tentativa de detectar o RNA viral, entretanto, somente os animais com sorologia positiva têm seus órgãos submetidos a diagnóstico molecular. Subseqüentemente à extração do material genômico, é realizada a técnica de

RT-PCR. São utilizados oligonucleotídeos descritos por Johnson *et al* (1997) referentes a regiões conservadas de diferentes hantavírus associados com roedores da subfamília Sigmodontinae. Para a síntese e amplificação do cDNA são utilizados *random primers* - *Random Hexamers* [50 ng/μL] (GIBCO[®]/Life technologies) e o *Mini Kit SuperScript II[™] Reverse Transcriptase* (Invitrogen[®]/Life technologies).

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

	MESES																							
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°	16°	17°	18°	19°	20°	21°	22°	23°	24°
Organização geral do projeto	X	X	X																					
Planejamento das expedições	X	X	X	X																				
Expedições de coleta		A1	A2	A3	A4			A1	A2	A3	A4		A1	A2	A3	A4			A1	A2	A3	A4		
Diagnóstico sorológico e molecular de hantavírus			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Identificação taxonômica dos roedores			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Extração de DNA, sequenciamento e análises filogeográficas de <i>Oligoryzomys nigripes</i>						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Estabelecimento de coleção científica de pequenos mamíferos				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Organização do banco de dados			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Divulgação dos resultados em congressos e eventos científicos												X						X						
Redação de artigos científicos													X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Redação de relatório de prestação de contas CNPq												X											X	X

A1, A2, A3, A4 – áreas de estudo 1, 2, 3 e 4 de cada Estado

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bandelt, H. J., Forster, P. e Rohl, A. (1999). "Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies." *Mol Biol Evol* **16**(1): 37-48.
- Bonvicino, C.R., Otazu, I.B., D'Andrea, P.S., 2002. Karyologic evidence of diversification of the genus *Thrichomys* (Rodentia, Echimyidae). *Cytogenet Genome Res* **97**, 200-4.
- Bharadwaj M, Botten J, Torrez-Martinez N, Hjelle B. 1997. Rio Mamore virus: genetic characterization of a newly recognized hantavirus of the pygmy rice rat, *Oligoryzomys microtis*, from Bolivia. *Am J Trop Med Hyg.* **57** (3): 368-74.
- Daszak, R., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D. Emerging Infectious Diseases of Wildlife – Threats to Biodiversity and Human Health. *Science*, v. 287, p. 443-449, 2000.
- Ferres M, Vial P, Marco C, Yanez L, Godoy P, Castillo C, Hjelle B, Delgado I, Lee SJ, Mertz GJ. 2007. Prospective evaluation of household contacts of persons with hantavirus cardiopulmonary syndrome in Chile. *J Infect Dis.* 2007 Jun 1;195(11):1553-5.
- Figueiredo LTM, Campos G, Rodrigues FB. Síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavirus: aspectos epidemiológicos, clínicos, do diagnóstico laboratorial e do tratamento. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34(1): 13-23.
- FNS. 1998. Versão preliminar do projeto de controle de hantavírus – CNZAP/CENEPI/FUNASA.FNS/MS.
- Gonzalez Della Valle M, Edelstein A, Miguel S, Martinez V, Cortez J, Cacace ML, Jurgelenas G, Estani SS, Padula P. 2002. Andes virus associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Argentina and determination of the precise site of infection. *Am J Trop Med Hyg.* **66** (6): 713-720.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D. e Wilson, A. C. (1991). "Evolution of the cytochrome b gene of mammals." *J Mol Evol* **32**(2): 128-144.
- Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, Williams RJ, Bryan RT, Mills JN *et al* 1997. Laguna Negra virus associated with HPS in Western Paraguay and Bolivia. *Virology* **238**: 115-127.

- Johnson, AM; Souza, LTM; Ferreira, IB; Pereira, LE; Ksiazek, TG; Rollin, PE; Peters, CJ & Nichol, ST. 1999. Genetic Investigation of Novel Hantaviruses Causing Fatal HPS in Brazil. *Journal of Medical Virology* 59:527–535
- Kruse H, Kirkemo AM, Handeland K 2004. Wildlife as source of zoonotic infections.
- Kumar, S., Tamura, K. e Nei, M. (2004). "MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment." *Brief Bioinform* 5(2): 150-163.
- Lamas, CC; Oliveira, RC; Bóia, MN; Kirsten, AH; Silva, AP; Maduro, R; Bragagnolo, C; Bezerra, L; Lemos, ERS. 2006. Seroprevalence of hantavirus infection in HIV positive individuals in Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brazil.
- LeDuc JW 1987. Epidemiology of Hantaan and related viruses. *Lab Anim Sci* 37: 413-418.
- Lee HW, Lee PW, Johnson K 1978. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 137: 298-308.
- Lee HW, Lee PW, Baek LJ, Song CK, Seong IW 1981. Intraspecific transmission of Hantaan virus, etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, in the rodent *Apodemus agrarius*. *Am J Trop Med Hyg* 30: 1106-1112.
- Lemos, E.R.S.; D'Andrea, P.S. 2006. Trabalho com animais silvestres. In: Martins EV; Martins AS; Silva FHAL; Lopes MCM; Moreno, MLV; Silva PCT. (Org.). *Biossegurança, informação e conceitos, textos básicos*. I ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, v. I, p. 273-288.
- Lima, J. F. S., Bonvicino, C. R. e Kasahara, S. (2003). "A new karyotype of *Oligoryzomys* (Sigmodontinae, Rodentia) from central Brazil." *Hereditas* 139(1): 1-6.
- Martinez VP, Bellomo C, San Juan J, Pinna D, Forlenza R, Elder M, Padula PJ. 2005. Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerg Infect Dis*. 11(12): 1848-53.
- Meyer BJ, Schmaljohn CS 2000. Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms. *Trends Microbiol* 8: 61-67.
- Mills, J.N.; Childs, J.E.; Ksiazek, T.G.; Peters, C.J.; Velleca, W.M. 1995. *Methods for Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing*. U.S. Department of Health & Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Geórgia, USA.

- Mills JN, Childs JE 1998. Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance of human health. *Emerging Infectious Diseases* 4, 529-537.
- Mills, JN. 2006. Biodiversity loss and emerging infectious disease: An example from the rodent-borne hemorrhagic fevers. *Biodiversity* 7(1): 2006.
- Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H *et al* 1993. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262: 914-917.
- Oliveira, RC ; Martinez, VP; Bellomo, C; Padula, PJ; Bonvicino, CR; Lima, DIF; Pereira, AP; Bragagnolo, C; Lima, LB; Caldas, ACS; Zeccer, S; D'Andrea, OS; Lemos, ERS. 2007. Identification of *Akodon montensis* as reservoir host of a novel hantavirus in South Brazil. VII International Conference on HFRS, HPS and Hantaviruses, Buenos Aires, Argentina, Abstract Book, p. 126.
- Padula PJ, Edelstein A, Miguel SD, Lopez NM, Rossi CM, Rabinovich RD 1998. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* 241: 323-330.
- Padula P, Rossi C, Della Valle M, Martinez PV, Colavecchia SB, Edelstein A *et al* 2000b. Development and evaluation of a solid phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. *J Med Microbiol* 49: 149-155.
- Padula P, M González Della Valle, M García Alai, P Cortada, M Villagra & A Gianella. 2002. Andes virus and first case report of Bermejo virus causing fatal pulmonary syndrome. *Emerging Infectious Disease* 8: 4376-439.
- Pardini, R., Souza, S.M., Braga-Neto, R. & Metzger, J.P. 2005. The role of Forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic Forest landscape. *Biological Conservation* 124: 253-266.
- Pereira LE. A atual situação dos hantavirus. *Vetores & Pragmas*. 4:28-30, 1999.
- Pereira, AP; Oliveira, RC; Favacho, ARM; Bragagnolo, C; Gerhardt, M; Teixeira, BR; Olifiers, N; D'Andrea, PS; Lemos, ERS. 2005. Detection of Hantavirus infection in *Oligoryzomys nigripes* by PCR technique in a non-endemic area of Rio de Janeiro State, Brazil - preliminary results. In: XVI Encontro Nacional de Virologia, Salvador/BA.

- Pires, A.S.; Fernandez, F.A.S. & Barros, C.S. 2006. Vivendo em um mundo em pedaços: efeitos da fragmentação florestal sobre comunidades e populações animais. Pp. 231-260 in Rocha, C. F. D.; Bergallo, H.G.; Sluys, M. V. & Alves, M. A. S. (eds). *Biologia da Conservação*, Essências Rima Editora. São Carlos, SP. 588pp.
- Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *Journal of Genetic Virology*.77:2677-2687, 1996
- Rivera, E.A.B. 2006. Eutanásia. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS (orgs.) *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Raboni SM, Probst CM, Bordignon J, Zeferino A, Santos CN. 2005. Hantaviruses in Central South America: phylogenetic analysis of the S segment from HPS cases in Paraná, Brazil. *J Med Virol*. 2005 Aug;76(4):553-62.
- Romano-Lieber NS, Yee J & Hjelle B. 2001. Serologic survey for hantavirus infections among wild animals in rural areas of São Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 43:325-327.
- Rosa ES, Mills JN, Padula PJ, Elkhoury MR, Ksiazek TG, Mendes WS, Santos ED, Araujo GC, Martinez VP, Rosa JF, Edelstein A, Vasconcelos PF. 2005. Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 5 (1): 11-9.
- Ruo SL, Li YI, Tong Z, Ma QR, Lui ZL, Tang YW, Ye KL, Xu ZY, McCormick JB, Fisher-Hoch SP. Retrospective and prospective studies of hemorrhagic fever with renal syndrome in rural China. *Journal of Infectious Diseases* 170:527-534, 1994.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schmidt, K.A. and R.S. Ostfeld. 2001. Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology* 82: 609-619.
- Silva MV, Vasconcelos MJ, Hidalgo NTR, Veiga APR, Canzian M, Marotto PCF, Lima VCP. 1997. Hantavirus pulmonary syndrome: report of the first three cases in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 39:231-234.
- Silva, MSB; Souza, GT; Moreli, ML; Borges, AA; Moraes, FA; Almeida, AMP; Figueiredo, LTM. 2005. Looking for hantavirus infection in wild rodents captured in

- Rio de Janeiro State and in the Northeast of Brazil. *Virus Reviews & Research* vol. 10 suppl. 01.
- Smith, M. F. e Patton, J. L. (1993). "The diversification of South America murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe." *Biol J Linn Soc* **50**: 149-177.
- Song, JW; Hilbe, M; Puorger, M; Goo, SH; Bennett, SN; Yanagihara, R. 2007. Novel hantavirus detected in the Eurasian Common Shrew (*Sorex araneus*). VII International Conference on HFRS, HPS and Hantaviruses, Buenos Aires, Argentina, Abstract Book, p. 35.
- Soulé ME & BA Wilcox. 1980. *Conservation Biology: an evolutionary-ecological perspective*. Sinauer Associates Inc. Publ., Massachusetts. 395pp.
- Spiropoulou C, Morzunov S, Feldman H, Sanchez A, Peters CJ, Nichol ST. Genome structure and variability of a virus causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 200:715-723, 1994.
- Suárez O.V, GR Cueto, R Cavia, IE Gómez Villafaña, DN Bilenca, A Edelstein, P Martínez, S Miguel, C Bellomo, K Hodara, PJ Padula & M Busch. 2003. Prevalence of Infection with Hantavirus in rodent population of Central Argentina. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 98(6): 727-732.
- Sutherst RW 2001. The vulnerability of animal and human health to parasites under global change. *International Journal for Parasitology* 31: 933-948.
- Suzuki, A; Bisordi, I; Levis, S.; Garcia, J.; Pereira, L.E.; Souza, R.; Sugahara, T.K.N; Pini, N.; Enria, D. & Souza, L.T.M. 2004. Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 10: 2127-2134.
- Swofford, D. L. (1993). *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, version 3.1.1. Illinois Natural History Survey, Champaign, IL, EUA.
- Weksler, M. e Bonvicino, C. R. (2005). "Taxonomy of pigmy rice rats genus *Oligoryzomys* Bangs, 1900 (Rodentia, Sigmodontinae) of the Brazilian Cerrado, with the description of two new species." *Arq. Mus. Nac.* **63**(1): 113-130.
- Yahnke CJ, Meserve PL, Ksiazek TG, Mills JN. Patterns of infection with Laguna Negra vírus in wild populations of *Calomys laucha* in the Central Paraguayan Chaco. *Am J Trop Med Hygiene* 2001; 65 (6): 768-776.