

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Pequenos Roedores como Hospedeiros das Espécies do Gênero *Rickettsia*
em Áreas Endêmicas para Febre Maculosa na Mesorregião de Campinas,
Estado de São Paulo**

Celso Eduardo de Souza

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**PEQUENOS ROEDORES COMO HOSPEDEIROS DAS ESPÉCIES DO
GÊNERO *Rickettsia* EM ÁREAS ENDÊMICAS PARA FEBRE
MACULOSA NA MESSORREGIÃO DE CAMPINAS,
ESTADO DE SÃO PAULO**

CELSO EDUARDO DE SOUZA

Sob a Orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ
Abril de 2010

599.323

S729p

T

Souza, Celso Eduardo de, 1963-
Pequenos roedores como
hospedeiros das espécies do gênero
Richettsia em áreas endêmicas para
febre maculosa na mesorregião de
Campinas, Estado de São Paulo /
Celso Eduardo de Souza - 2010.
50 f.: il.

Orientador: Adivaldo Henrique da
Fonseca.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 30-34.

1. Roedor - Teses. 2. Bactérias
- Teses. 3. Febre das Montanhas
Rochosas - Teses. I. Fonseca,
Adivaldo Henrique da, 1953-. II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias. III.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

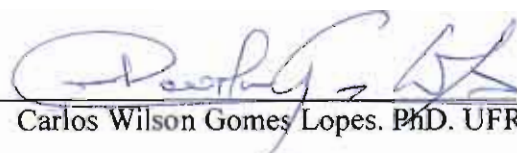
CELSO EDUARDO DE SOUZA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/04/2010



Adivaldo Henrique da Fonseca, PhD. UFRRJ
(Orientador)



Carlos Wilson Gomes Lopes, PhD. UFRRJ



Adriano Pinter dos Santos, PhD. SUCEN

Dedico à minha esposa Lígia e aos meus queridos filhos, Celso, Luiz Gustavo, Edison e Ana Lígia, pelo amor, compreensão e paciência.

Aos meus pais, porque sei que onde quer que estejam, estão torcendo por mim.

À minha irmã Maria Angelina pelo carinho e incentivo.

A todos obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária (IV) da UFRRJ pela orientação, amizade, confiança e paciência.

Ao Professor Dr. Carlos Luiz Massard do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária (IV) da UFRRJ pela amizade e pelo entusiasmo contagiante.

Ao Professor Dr. Marcelo Bahia Labruna da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – SP pelo fornecimento das lâminas de RIFI.

Ao Pesquisador Dr. Adriano Pinter dos Santos da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) São Paulo - SP, pela realização dos PCR.

Aos meus colegas de trabalho da SUCEN regional de Campinas - SP, que tanto me apóiam e incentivaram no dia a dia em especial a Diretora Regional Renata Carporale Mayo.

Ao Médico Veterinário Francisco Conrado Uchoa e a Bióloga Juliana da Silva ambos da SUCEN – Mogi Guaçu – SP pela ajuda nos trabalhos de campo.

A equipe de campo da SUCEN – Mogi Guaçu – SP, Pedro, Osvaldo, Jairo, Rosemir e Carlos, que não medirão esforços para me apoiar.

Ao Dr. Luiz Eloi Pereira pesquisador do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo – SP, pela identificação dos roedores.

A pesquisadora Dra Márcia Holcman da SUCEN – São Paulo pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos colegas do Laboratório de carrapatos da SUCEN – Mogi Guaçu, em especial a Mara Lucia Menocci que colaborou na realização das provas sorológicas e ao Biólogo Leonardo que me deu um apoio na preparação dos mapas e fotos.

Aos amigos e colegas de quarto do alojamento da Pós Graduação que me deram apoio e incentivo, Marcus Sandes, Julio Aguiar e Antônio Amélia Muralame Tembue.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ Antônio Amélia Muralame Tembue, Bruna Baeta, Charles Passos Rangel, Fábio Jorge Silva, Fabíola do Nascimento Corrêa, Jania de Rezende, Jenevaldo Silva Barbosa, Matheus Cordeiro, Rafaella Câmara Teixeira, Raquel Silva Lisboa pela amizade, convivência.

Aos animais, indispensáveis, que mesmo sem entenderem o motivo daquela movimentação em torno deles, permitiram que coletássemos o material para o trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pela convivência.

Aos funcionários do Instituto de Veterinária da UFRRJ.

À todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente no meu trabalho
Meu muito obrigado!

RESUMO

SOUZA, Celso Eduardo. **Pequenos roedores como hospedeiros das espécies do gênero *Rickettsia* em áreas endêmicas para Febre Maculosa na mesorregião de Campinas, Estado de São Paulo.** 2010. 39p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

A febre maculosa brasileira (FMB) é uma doença infecciosa aguda e tem como agente etiológico a *Rickettsia rickettsii* que é uma bactéria gram negativa intracelular obrigatória e transmitida através da picada de carrapatos infectados. Na epidemiologia da febre maculosa, os hospedeiros amplificadores em geral são animais silvestres, os quais exercem função importante por desenvolverem rickettsemia temporária. Este estudo teve como objetivos estudar a ocorrência de anticorpos da classe IgG anti *Rickettsia* spp. do grupo da febre maculosa no soro dos pequenos roedores silvestres, detectar através da PCR a presença de espécies de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa em fragmentos de baço dos roedores e esclarecer a participação destes animais como hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* em áreas endêmicas na região de Campinas estado de São Paulo. Foram selecionados os municípios de Jaguariúna, Pedreira e Piracicaba por situarem-se em área endêmica e com registro de casos em seres humanos. Foram utilizadas um total de cem armadilhas tipo *Sharm* distribuídas em linhas. Um total de 222 roedores das seguintes espécies foram capturadas: 35 (15,6%) *Akodon* sp, 61 (27,1%) *Necomys lasiurus*, 35 (15,6%) *Calomys tener*, 19 (8,4%) *Mus musculus*, 1 (0,4%) *Nectomys squamipes*, 63 (28,0%) *Oligoryzomys nigripes*, 1 (0,4%) *Oxymycterus nigripes* e 7 (3,1%) *Rattus rattus*. Todos os roedores foram examinados, mas nenhum carrapato foi encontrado. Foram analisados um total de 186 soros para detecção de anticorpos da classe IgG anti- *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *R. felis*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephalus* e *R. bellii*. Verificou-se que 39 (20,97%) dos soros foram reativos a pelo menos para uma das espécies *Rickettsia* com títulos variando de 1:64 a 1:512 e 147 (79,03%) foram negativos. A prevalência de anticorpos da classe IgG anti *R. rickettsii* encontrada nestes roedores foi de 9,34%. Dos 186 animais examinados apenas 17 foram positivos, destes, 15 animais apresentaram títulos de 1/64 e apenas um animal reagiu até o título de 1/512. Foram processados 182 baços pela técnica da PCR e não foi detectado *Rickettsia* spp. em nenhum deles. Diante dos resultados apresentados podemos concluir que os pequenos roedores não são os hospedeiros amplificadores de *Rickettsia* do grupo da Febre Maculosa na área estudada.

Palavras-chave: *Rickettsia*, *Rickettsia rickettsii*, Roedores, Febre Maculosa.

ABSTRACT

SOUZA, Celso Eduardo. **Small rodents as hosts of the genus *Rickettsia* in endemic areas for Spotted Fever in the region of Campinas, state of São Paulo.** 2010. 39p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences, Animal Health). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Brazilian spotted fever (BSF) is an acute infectious disease and its etiologic agent *Rickettsia rickettsii* is a gram negative intracellular binding and transmitted through the bite of infected ticks. In the epidemiology of spotted fever, the amplifying hosts in general are wild animals. They play an important role for developing temporary rickettsemia, thus contributing to the possibility of infection of new generations of ticks. This study aims to verify the occurrence of anti rickettsiae IgG antibodies of the spotted fever group in the serum of wild rodents. The presence of *rickettsiae* of the brazilian spotted fever group in fragments of the spleen of wild rodents was studied by PCR and clarify the involvement of small rodents as amplifying hosts of *R. rickettsii* in endemic areas in the region of Campinas in São Paulo state. Thus, we selected the municipalities of Jaguariúna, Pedreira and Piracicaba, where human been cases were detected. Through the use of one hundred traps distributed in Sharm lines, 222 rodents were captured the following species: *Akodon* sp 35 (15.6%), *Necomys lasiurus* 61 (27,1%), *Calomys tener* 35 (15,6%), *Mus musculus* 19 (8,4%), *Nectomys squamipes* 1 (0,4%), *Oligoryzomys nigripes* 63 (28,0%), *Oxymycterus nigripes* 1 (0,4%), *Rattus rattus* 7 (3,1%). All rodents were examined, but no tick was found. We analyzed a total of 186 serum samples for antibodies of the IgG class anti-*Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *R. felis*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* and *R. bellii*. It was found that 39 (20.97%) sera were reactive to at least one *Rickettsia* spp. with titers ranging from 1:64 to 1:512 and 147 (79.03%) were negative. The prevalence of anti *R. rickettsii* spp antibodies IgG found in these mice was 9.34%. Of the 186 animals examined were positive only 17 of these, 15 animals showed evidence of 1/64 and only one animal reacted to the title of 1/512. One hundred and fifty six spleens were processed by PCR and was not detected in *Rickettsia* spp in any of them. Considering the results presented we can conclude that small rodents are not amplifying hosts of *Rickettsia* of Brazilian spotted fever group in the study area.

Key words: *Rickettsia*, *Rickettsia rickettsii*, Rodents, Spotted Fever.

LISTA DE TABELAS

CONTEÚDO	Página
Tabela 1. Agrupamento das amostras de baços dos pequenos roedores testadas na PCR para <i>Rickettsia</i> spp. por localidade, espécie e total.	19
Tabela 2. Iniciadores utilizados para PCR para amplificação de diferentes genes de <i>Rickettsia</i> .	20
Tabela 3. Distribuição e frequência dos animais capturados nas variáveis: localidade, espécie, faixa etária, sexo, sorologia.	22
Tabela 4. Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), por espécies de <i>Rickettsias</i> testadas com seus respectivos títulos máximos e prevalência.	23
Tabela 5. Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti- <i>Rickettsias</i> , por espécie de roedores e localidades pesquisadas.	24
Tabela 6. Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos IgG anti - <i>Rickettsia rickettsii</i> dos roedores capturados, quanto a frequência em Localidade, Idade e sexo e resultado do teste Qui-quadrado.	25
Tabela 7. Resultados da reação (PCR) para detecção <i>Rickettsia</i> em roedores, por espécie e localidades da mesorregião de Campinas, estado de São Paulo.	26

LISTA DE FIGURAS

CONTEÚDO

Página

- Figura 1** A. Mapa do estado de São Paulo, Brasil, mostrando em destaque de vermelho os municípios Jaguariúna, Pedreira e Piracicaba; B. Imagem de satélite do Sítio Monte Alegre, Piracicaba; C) Imagem de satélite referentes às localidades: Fazenda Monte Nilo e Nadir Figueiredo – Município de Pedreira.; D. Imagem de satélite do Rancho da Terra, Jaguariúna; Imagem de satélite do Recanto do Agape e F) Imagem de satélite da Fazenda Santa Júlia, Município de Jaguariúna. 13
- Figura 2** Sequência os procedimentos realizados na pesquisa de campo com os pequenos roedores. A – Anestesia; B – Coleta de sangue; C – Deslocamento cervical; D – Pesagem; E – Biometria; F – Necropsia e retirada do baço. 16

SUMÁRIO

CONTEÚDO	Páginas
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Conceito, Etiologia e Epidemiologia	3
2.2 Rickettsias do Grupo da Febre Maculosa em Animais Vertebrados	5
2.3 Ectoparasitos em Pequenos Roedores	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Áreas de Estudo	11
3.2 Características Geográficas dos Municípios Escolhidos	11
3.3 Coletas dos Pequenos Roedores	14
3.4 Etapa Laboratorial	17
3.4.1 Local de Processamento	17
3.4.2 Reação de imunofluorescência indireta	17
3.4.3 Reação em cadeia pela polimerase	17
4 RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	27
5 CONCLUSÕES	29
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
7 ANEXOS	35

1 INTRODUÇÃO

A febre maculosa brasileira (FMB) é uma doença infecciosa aguda e tem como agente etiológico a *Rickettsia rickettsii* que é uma bactéria gram negativa intracelular obrigatória e transmitida através da picada de carrapatos infectados. Esta bactéria tem tropismo pelas células endoteliais dos hospedeiros vertebrados, causando uma vasculite em diferentes regiões do organismo.

No Brasil, conforme dados do Ministério da Saúde, esta enfermidade já foi relatada em pelo menos nove estados: São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Bahia, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Rondônia.

A FMB é um problema de saúde pública em ascensão no estado de São Paulo com aumento no número de casos humanos e sempre acompanhados de altas taxas de letalidade (LIMA et al., 2003; KATZ, et al., 2009). De acordo com os dados oficiais do Centro Vigilância Epidemiológica (CVE) de 1998 a 2009 foram registrados 323 casos, sendo que destes 80% ocorreram em 31 municípios pertencentes à região de Campinas.

No Brasil, o carrapato *Amblyomma cajennense* é considerado como o principal vetor. Ele completa uma geração por ano, com os três estádios parasitários marcadamente distribuídos ao longo deste período. As larvas ocorrem basicamente entre os meses de março a julho. As ninfas entre os meses de julho a novembro e os adultos, entre os meses de novembro a março (VIEIRA, et al., 2009).

Apesar deste carrapato ser o principal vetor e reservatório desta bactéria na natureza por apresentar transmissão transovariana e transestadial, em várias espécies de carrapatos, os níveis infectados por *R. rickettsii* são baixos, geralmente $\leq 1\%$ sob condições naturais isso devido a patogenicidade desta bactéria para os carrapatos. (NIEBYLSKI et al., 1999). Portanto para manutenção desta bactéria na natureza a participação dos animais vertebrados é crucial.

Na epidemiologia da febre maculosa, os hospedeiros amplificadores em geral são animais silvestres que exercem uma função importante por desenvolverem rickettsemia temporária, contribuindo desta forma para a possibilidade da infecção de novas gerações de carrapatos, os quais têm o potencial de infectar animais no peri domicílio ou até mesmo seres humanos (BURGDORFER, 1988).

No Brasil ainda não se conhece os hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii*, mas os roedores tem potencial para assumir esta função. Segundo Spielman e Hodgson (2000), para que um animal seja um bom hospedeiro amplificador de *Rickettsia* ele deve apresentar pelo menos cinco quesitos: 1) Ser abundante nas áreas endêmicas; 2) Ser bom hospedeiro do carrapato vetor em condições naturais; 3) Ser susceptível a infecção por *R. rickettsii*; 4) Manter *R. rickettsii* circulantes em níveis plasmáticos suficientes para infectar carrapatos e 5) Ter alta taxa de renovação populacional.

Na região de Campinas os prováveis locais de infecção contidos nas fichas de investigação epidemiológica são áreas de matas ciliares pertencentes às bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Jaguari, Atibaia, Camanducaia e/ou em parques públicos, em atividades de lazer ou ocupação profissional. Salienta-se ainda que nestas áreas, há presença de populações de diversas espécies de roedores frequentes em toda a extensão destas bacias

hidrográficas. Um estudo recente na região de Campinas indicou a associação entre a presença destes roedores e as altas infestações por *A. cajennense*.

Os objetivos deste estudo foram verificar a ocorrência de anticorpos da classe IgG anti-Rickettsias do grupo da febre maculosa no soro dos pequenos roedores silvestres; detectar através da PCR a presença de rickettsias do grupo da febre maculosa em fragmentos de baço dos pequenos roedores silvestres; esclarecer a participação de pequenos roedores como hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* na cadeia epidemiológica da transmissão da febre maculosa em áreas endêmicas na região de Campinas estado de São Paulo.

2 REVISÃO LITERATURA

2.1 Conceito, Etiologia e Epidemiologia

Atualmente, as doenças transmitidas por carrapatos têm alcançado grande importância para a saúde pública em todo mundo (DUMLER; WALKER, 2005). No Brasil a principal doença é a FMB devido a sua alta taxa de letalidade (LIMA, et al., 2003; KATZ, et al., 2009).

Historicamente em 1899, Maxcy descreveu nos Estados Unidos, as manifestações clínicas da febre das Montanhas Rochosas no período de 1906 a 1909, Ricketts conseguiu com sucesso a transmissão desta doença para porquinho da índia, e comprovou que o carrapato *Dermacentor anderson* é o vetor, e observou formas da bactéria em esfregaços preparados a partir de tecidos destes carrapatos (RICKETTS, 1909).

No ano de 1929, em São Paulo, José de Toledo Piza iniciou a distinção da febre maculosa das doenças exantemáticas no Brasil inclusive chegando a demonstrar semelhança à entidade nosológica descrita pelos americanos como "rocky mountain spotted fever" (PIZA, 1932).

A partir da década de 40 esta doença passou um período denominado de um silêncio epidemiológico com poucas notificações, de 1942 até 1985 existe na literatura apenas a citação de 53 casos todos registrados no Hospital Emilio Ribas em São Paulo provenientes de municípios da região metropolitana de São Paulo (TIRIBA, 1999; LEMOS et al., 2001; GALVÃO, 2004), uma das justificativas para este período é provavelmente devido a introdução ao uso de antibióticos de forma indiscriminada.

Atualmente a febre maculosa tem sido reportada no Canadá, EUA, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Brasil e Argentina (DUMLER; WALKER, 2005; PADDOCK et al., 2008).

A partir da década de 80, a FMB novamente foi descrita sob a forma aguda e em "clusters", além de ocorrer de forma isolada na região de Campinas estado de São Paulo. Do ponto de vista epidemiológico, foram levantadas algumas hipóteses como determinantes para o retorno da doença. Entre elas a invasão de focos naturais, a disseminação da doença a partir da ação do homem nesses focos, levando à formação de focos modificados, a disponibilidade diagnosticar e o interesse pela classe médica. Outro fato que vem chamando atenção é aumento da população de capivaras devido à falta de predador natural e o desrespeito a legislação vigente com relação a destruições das matas ciliares para aumento de produção de milho e cana de açúcar.

Segundo Labruna. (2009) até o ano 2000, apenas 3 espécies de *Rickettsia* eram conhecidas na América do Sul *R. rickettsii*, transmitidas pelos carrapatos *A. cajennense* e *A. aureolatum*, assinalada na Colômbia, Argentina e Brasil, onde é o agente da Febre Maculosa. *Rickettsia prowazekii*, transmitidas por piolhos causador do tifo epidêmico nas

áreas altas do Peru. *Rickettsia typhi* transmitido pelas pulgas causando o tifo endêmico em vários países. Durante este novo século pelo menos sete outras espécies de *Rickettsia* foram reportadas na América do Sul: *Rickettsia felis* infectando pulgas e carrapatos, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia massiliae*, *Canditatus "Rickettsia amblyommii"*, *Rickettsia bellii*, *Rickettsia rhipicephali* e *Canditatus "Rickettsia andeanae"*. Entre essas *Rickettsias* somente *R. felis* e *R. parkeri*, são atualmente como patogênicas aos seres humanos, *R. rickettsii* é agente naturalmente raro menos de 1% dos indivíduos são infectados em poucas populações de carrapatos. Em contraste, *R. parkeri*, *Canditatus "Rickettsia amblyommii"*, *Rickettsia bellii*, *Rickettsia rhipicephali*, são normalmente encontradas infectando 10 a 100% dos indivíduos em diferentes populações de carrapatos.

Além disso, com a utilização de ferramentas moleculares, ocorreu a descrição de outras espécies envolvidas, além de *R. rickettsii*, como *R. felis*, *R. parkeri* e *R. bellii*, sendo esta última ainda sem associação com doença humana no Brasil (LEMOS et al., 2001; GALVÃO, 2004; SILVA; GALVÃO, 2004; HORTA et al., 2007; PINTER et al., 2008).

Em estudos realizados por Lemos et al., (2001) em casos FMB ocorridos no Município de Pedreira, SP a idade média de ocorrência da doença pode variar bastante, com pessoas doentes na faixa etária de 3 a 59 anos. Ainda sobre os referidos casos, observou-se que ocorreram no período de junho a outubro.

Recentemente Katz, et al. (2009) descreveu uma casuística dos casos ocorridos no estado de São Paulo com relação a distribuição por sexo e faixa etária. Observa-se maior percentual de casos do sexo masculino e nas faixas etárias acima de 10 anos de idade. No entanto, na faixa etária de 0 a 9 anos não se observou diferença significativa entre os sexos. Provavelmente, entre as situações de risco que podem ser observadas, estão as que estiveram relacionadas a situações de exposição no lazer e/ou trabalho, embora este dado não pode ser analisado nas fichas investigações epidemiológicas.

Outro atributo analisado em relação à exposição de risco foi o parasitismo por carrapato. Observou-se que 68,8% dos casos relataram o parasitismo e em 17,5%, a informação era ignorada. Notou-se ainda, entre os casos que evoluíram para óbito um percentual de ignorados ainda maior (33,9%) (Tabela 2).

O principal vetor da FMB no Brasil é *A. cajennense* (DIAS; MARTINS, 1939). Este carrapato completa uma geração por ano, mostrando os três estádios parasitários marcadamente distribuídos ao longo do ano. As larvas ocorrem basicamente entre os meses de março a julho. As ninfas entre os meses de julho a novembro e os adultos, entre os meses de novembro a março (VIEIRA et al., 2009).

Estudos realizados nos EUA demonstraram que *R. rickettsii* é transmitida transovarianamente e transtetradialmente em várias espécies de carrapatos, entretanto, os níveis de *R. rickettsii* em carrapatos são muito baixos, geralmente $\leq 1\%$ sob condições naturais isso devido a patogenicidade desta bactéria para os carrapatos. (NIEBYLSKI et al., 1999)

Katz, et al. (2009) apesar de ter transmissão focal, a FMB apresenta uma nítida variação sazonal, com maior número de casos nos meses de junho a setembro. O período é coincidente com a maior infestação por ninfas de *A. cajennense*. Vale observar que essa sazonalidade não ocorre com *A. aureolatum*. Ao separar-se essa distribuição mensal entre a Grande São Paulo e o interior do Estado, observa-se que a sazonalidade não se repete na primeira, onde existem registros de frequência próxima durante todo o ano.

2.2 Rickettsias do Grupo da Febre Maculosa em Animais Vertebrados

Na epidemiologia da febre maculosa, a importância dos animais silvestres e domésticos é crucial por desenvolverem rickettsemia temporária. Desta forma, possibilitando a infecção de novas gerações de carrapatos e servirem também de dispersor de carrapatos infectados para o peridomicílio ou mesmo seres humanos (BURGDORFER, 1988).

Na década de 1930, foram realizados alguns trabalhos sobre a importância dos cães na epidemiologia da FMB. Segundo Dias (1937), o cão representa seguramente um fator importante na difusão da FMB, veiculando-os carrapatos infectados para as proximidades ou para o próprio domicílio humano. Nos estados de São Paulo e Minas Gerais, por várias vezes, foram achados carrapatos infectados em cães em zonas atingidas pela doença.

Gomes (1933) assinalou pela primeira vez o fato de em São Paulo *A. striatum* (= *A. aureolatum*) adulto, três dias após ser coletado em um cão na casa onde ocorreu um caso humano de FMB foi levado ao laboratório, triturado e inoculado em cobaias, que reagiram febrilmente e apresentaram reação escrotal, tendo sido este agente identificado por passagens subseqüentes em cobaias.

Em Minas Gerais Moreira; Magalhães (1935) obteve o agente da FMB após a inoculação de dois carrapatos *A. cajennense* coletados de um cão ao redor de Belo Horizonte, porém as cobaias inoculadas com sangue triturados de pulgas deste mesmo animal não tiveram nenhuma reação.

Badger (1933) demonstrou que a permanência do agente na circulação é transitória e relativamente curta, pois conseguiu re-isolar por inoculações em cobaias, apenas no quarto, no sexto e no oitavo dias após a inoculação do agente no organismo do cão.

Magalhães (1957) relatou a ocorrência de um cão positivo que residia em local onde houve caso humano de FMB através da utilização da técnica da reação de Weil-Felix.

Travassos (37) isolou um agente que se identificou ao da Febre Maculosa de gambá *Didelphys aurita* e *Didelphys paraquayensis*, (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935; TRAVASSOS, 1937).

Continuando as pesquisas na década de 1940 sobre os possíveis depositários transitórios do agente da febre maculosa, Travassos e Vallejo (1942a) demonstraram a infecção experimental em laboratório do agente da febre maculosa em preá *Cavia apera* e capivara *Hydrochoerus capybara*. Com efeito, esses cavídeos foram sensíveis às inoculações do agente etiológico, sendo que na *C. apera* a infecção se processa de modo idêntico ao da cobaia, não resistindo o animal. Nas capivaras a infecção se faz de modo benigno. Embora de modo mais benigno, o agente circula no organismo da capivara por período prolongado acima de 11 dias. Além da circulação do agente da FMB no sangue da capivara acima de 11 dias, demonstraram a possibilidade de se infectarem carrapatos, sendo que *R. rickettsii* não sofreu diminuição de sua virulência após passagem no organismo da capivara.

Experiências realizadas por Travassos; Vallejo (1942b) comprovaram a transmissão transestadial do carrapato *A. cajennense* alimentado em capivaras experimentalmente

infectadas e, posteriormente, transmitindo a infecção por picada a outros animais e possivelmente ao homem.

Magnarelli et al. (1983), realizou-se um levantamento de carrapatos e um inquérito sorológico em pelo menos 10 espécies de diferentes mamíferos em um foco de febre das montanhas rochosas em Connecticut, EUA. Neste estudo foram coletados 347 carrapatos adultos *D. variabilis*. Cinquenta apresentaram organismos semelhante *rickettsia-like* sendo que 14% dos carrapatos pesquisados foram positivos ao teste da hemolinfa. Dos testes da imunofluorescência realizados nos soros dos animais pesquisados 4,6% foram confirmados para o grupo da febre maculosa (SFG).

Sexton et al. (1993) relataram dois caninos positivos à microimunofluorescência onde ocorreram casos no Estado do Espírito Santo.

Lemos et al. (1996b) reportou-se primeiro isolamento de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa em *A. dubitatum* coletados em *H. hydrochaeris* no município de Pedreira, SP - Brasil.

Nos EUA é reconhecida a doença causada por *R. rickettsii* ("Rocky Mountain spotted fever"- RMSF) em caninos, com os sintomas caracterizados por necrose dos tecidos da pele, andar cambaleante, febre, mal estar, vômito com sangue e diarreia (NICHOLSON et al., 2006).

As manifestações clínicas em caninos e no homem são similares e a doença em cães pode preceder a doença em pessoas. Verificou-se no âmbito molecular que a espécie *R. rickettsii* de caninos foi altamente homóloga àquela que causou doença em pessoas de uma mesma região (KIDD et al., 2006).

No Brasil, casos naturais de FMB foram recentemente descritos em caninos por Labruna (2009b), mas experimentalmente foi visto que a doença pode ocorrer com sintomas muito parecidos com os relatados nos EUA, com período de rickettsemia entre 3 a 8 dias após a inoculação ou infestação por carrapatos que se manteve por 3 a 13 dias. Provavelmente, a doença é confundida com ehrlichioses que é uma doença com os sintomas clínicos e hematológicos bastante similares com os da FMB (PIRANDA et al., 2008).

Em um estudo em área endêmica e área não endêmica de São Paulo, verificou-se que 12 (36,4%) dos 33 caninos da área endêmica foram positivos na RIFI e apenas 4 (12,9%) dos 31 caninos de área não endêmica foram positivos na RIFI para RGFM. Dos equinos, sete (77,8%) dos nove em uma área endêmica e 3 (27,3%) dos 11 de área não endêmica foram soro reativos. Os resultados mostraram que a prevalência de anticorpos anti-RGFM foi significativamente maior em caninos e equinos de áreas endêmicas quando comparados com os de área não endêmica. Este trabalho reforça que a epidemiologia da FM está intimamente associada com as espécies de carrapatos e seus hospedeiros vertebrados (LEMOS et al., 1996a).

Horta et al. (2004) detectaram anticorpos contra *R. rickettsii* em 17 (77,3%) equinos e em 5 (31,3%) dos caninos em área endêmica de São Paulo. Destes, dois caninos e sete equinos apresentaram anticorpos específicos contra *R. rickettsii*, pois mostraram títulos pelo menos quatro vezes maior que contra as outras *rickettsias* testadas. Além de *R. rickettsii*, também foram detectados anticorpos contra *R. felis*, *R. bellii* e anticorpos altamente relacionados contra *R. africae* e *R. parkeri*, mostrando a evidência de que outras espécies

de *rickettsias* podem infectar animais domésticos. Tais resultados sugerem que equínos podem ser sentinelas de FMB mesmo antes da ocorrência de casos humanos. É sugerido modelo para áreas endêmicas caracterizado por alta frequência de equínos sorologicamente positivos, seguido de uma menor frequência em caninos e ainda menor ou ausência de humanos positivos.

Ao comparar duas áreas em São Paulo, uma endêmica e outra não endêmica para FMB, verificou-se que a maioria dos equínos e poucos caninos foram soropositivos. Em contrapartida, na área considerada não-endêmica nenhum cão ou equino apresentou reatividade contra *R. rickettsii*, embora estivessem expostos a carrapatos da espécie *A. cajennense*. Os resultados deste trabalho indicam que a pesquisa na sorologia de equínos é um método útil para a vigilância de FMB em áreas onde os humanos estão expostos ao carrapato *A. cajennense* (SANGIONI et al., 2005). Isso foi também observado por Souza et al., 2008 em inquérito sorológicos em capivaras em áreas com casos humanos as capivaras eram reagentes para *R. rickettsii*, enquanto capivaras de áreas sem casos humanos de febre maculosa as capivaras eram negativas.

No estudo com objetivo de verificar a infecção em animais por rickettsias em cinco áreas do estado de São Paulo, foram encontrados soros positivos tanto para *R. rickettsii* como para *R. parkeri*. Foi considerado que alguns cães e equínos produziram anticorpos contra *R. rickettsii* por terem apresentado título pelo menos quatro vezes maior. Ainda existe a possibilidade de que além de *R. rickettsii*, outras rickettsias podem estar envolvidas na FM, como *R. parkeri* e *R. felis*. Foram positivos sorologicamente, pela RIFI, 60% de cães, 72,9% de equínos e 68,1% de marsupiais com título a 1:64 para pelo menos um dos antígenos testados (*R. parkeri*, *R. rickettsii*, *R. felis* e *R. bellii*). Neste trabalho sugere-se que alguns casos de FMB diagnosticados no estado de São Paulo possam ter sido causados por outras RGFM como *R. parkeri* ou *R. felis* (HORTA et al., 2007).

Em Rondônia foi verificado que 11,6% e 3,9% de caninos de região rural e urbana respectivamente, foram soros positivos a pelo menos uma das seis espécies de Rickettsia testadas (*R. bellii*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. felis*). Na área rural, três soros mostraram títulos para *R. parkeri* pelo menos quatro vezes mais alto que para qualquer dos outros antígenos, sendo considerados homólogos para *R. parkeri* ou de genótipo altamente relacionado. Também seguindo o mesmo critério, dois soros de caninos de região rural foram considerados homólogos para *R. amblyommii*, dois outros para *R. rhipicephali* e um de cão urbano para *R. parkeri* (LABRUNA et al., 2007b).

Em estudo verificou-se que sete dos 25 soros de cães mostraram títulos para *R. rickettsii* pelo menos quatro vezes maior que qualquer dos outros antígenos testados (*R. felis*, *R. parkeri* e *R. bellii*), sendo os títulos de anticorpos atribuídos ao estímulo de infecção por *R. rickettsii*. De acordo com os resultados, foi mostrado que cães foram importantes sentinelas para a presença de *R. rickettsii* onde o carrapato *A. aureolatum* considerado o principal vetor de FMB na região estudada (PINTER et al., 2008).

Moraes-Filho et al. (2008) realizaram estudo em cães de uma localidade onde foi identificada *R. rickettsii* no carrapato *R. sanguineus*. Foram selecionados 23 caninos, destes 16 (69,6%) foram reativos à RIFI, com título variando de 1:256 a 1:32.768. Dos três animais que eram da propriedade onde tinham os carrapatos infectados tiveram o título de 1:8.192 e 1:32.768 e, o terceiro canino foi negativo.

No Rio Grande do Sul foi realizado estudo epidemiológico em caninos para verificação de anticorpos anti-*R. rickettsii* e outras RGFM e observou-se uma frequência de 33,7% soros reativos, tendo verificado que os caninos que tinham contato com pastos e matas tiveram 2,138 vezes mais chance de serem sororeativos em comparação aos que não frequentaram estes ambientes (SAITO et al., 2008).

Em estudo para determinar as espécies de mamíferos silvestres e espécies de aves como hospedeiros naturais de *R. rickettsii* foi relatado que 15 diferentes espécies de mamíferos das Ordens *Rodentia*, *Lagomorpha*, *Marsupialia*, *Carnivora* e *Artiodactyla* e, 18 espécies de aves das Ordens Passeriformes, Ciconiiformes e Piceiformes apresentaram anticorpos contra RGFM. Foram detectadas sete cepas de RGFM, sendo uma em coelhos (*Oryctolagus* sp.), uma em gambás (*Opossum*) e cinco em roedores silvestres. Esses achados indicam a complexidade do ecossistema em que *R. rickettsii* é mantida e também identifica algumas das comunidades dentro do ecossistema envolvidas na rickettsiose transmitidas por carrapatos (BOZEMAN et al., 1967).

Horta et al. (2007) atentam para a importância de gatos domésticos e marsupiais como bons sentinelas devido seus hábitos silvestres, enquanto que os equinos ficam somente a pasto e caninos podem ter ou não hábitos silvestres.

Experimentalmente, *D. aurita* apresentaram infecção por *R. rickettsii*, mas não apresentaram sintomatologia clínica. O período de rickettsemia foi longo (30 dias). A taxa de infecção de carrapatos não infectados alimentados em animais com rickettsemia foi baixa (5% e 18%), considerando que outros hospedeiros amplificadores, como por exemplo, capivaras, tenham uma maior significância ecológica para a história natural de *R. rickettsii* no Brasil (HORTA et al., 2008).

Souza et al., (2009), avaliou a infecção da capivara pela *Rickettsia rickettsii* e seu papel como hospedeiro amplificador na transmissão horizontal da *R. rickettsii* em *A. cajennense*. Dois grupos de 2 capivaras cada foram avaliados: no dia 0, o grupo 1 (G1) foram infestados pelos carrapatos infectados pela *R. rickettsii* e o grupo 2 (G2) foram inoculados intraperitonal com *R. rickettsii*., dois grupos adicionais foram grupos controles, não exposto a *R. rickettsii*., sendo C G1, o grupo controle do G1 e C G2, o grupo controle do G2. As amostras de sangue foram coletadas a cada 3 dias durante 30 dias, e usadas para inocular cobaias intra-peritonalmente; extração de DNA seguida da PCR em real time atingindo o gene rickettsial e gene glta; III hematologia; IV – detecção de anticorpos reativos anti-*R. rickettsii* pela RIFI. O sangue foi também coletado das capivaras G1 a cada 10 dias no período de 30 a 146 dias a ser testado pela sorologia. Capivaras foram infestadas por ninfas de *A. cajennense* do 3 ao 18 dia. Ninfas ingurgitadas foram coletadas permitindo a mudança para adultos numa incubadora. Depois disso, e subsequentemente foram testados pela PCR. Todas as capivaras do G1 e G2 tornaram a ser infectadas pela *R. rickettsii* como demonstradas pela continuidade detectada dos 6 dia (cap.62) ou 9 dia (cap. G1) ao 18 dia pós inoculado ou infestado com carrapatos infectados com *R. rickettsii*. Um total de 20 a 25% e 30 a 35% dos carrapatos previamente alimentados nas capivaras G1 e G2, respectivamente, tornaram infectados pela *R. rickettsii*. O estudo demonstrou que *R. rickettsii* foi capaz de infectar as capivaras sem causar a doença clínica, induzindo rickettsemia a ser capaz de causar infecção nas cobaias e carrapatos. Nossos resultados indicam que as capivaras atuam como hospedeiros amplificadores da *R. rickettsii* em carrapatos *A. cajennense* no Brasil.

Há relatos de capivaras sororreativas para *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*, demonstrando o seu envolvimento na epidemiologia FMB (LEMOS et al., 1996b; PACHECO et al., 2007b). Estudo sorológico realizado por Souza et al. (2008), encontrou uma prevalência geral de 32,2% de capivaras sororreativas mas algumas localidades com prevalências de 59,4% sororreativas para *R. rickettsii*.

2.3 Ectoparasitas em Pequenos Roedores

Durante levantamento da fauna realizado por (REIS et al., 2008), trinta e seis exemplares de pequenos mamíferos silvestres foram coletados em áreas adjacentes ao rio Itapecuru (Médio Itapecuru) e da Área de Preservação Ambiental do Inhamum, Maranhão, Brasil. Esses exemplares foram amostrados para a presença de ectoparasitos. Os seguintes espécimes da ordem Rodentia com seus respectivos ectoparasitos foram identificados: *Akodon* sp. (*Androlaelaps* sp. e *Laelaps* sp.), *Oecomys* sp. (*Androlaelaps* sp. e *Amblyomma cajennense*), *Oligoryzomys* sp. (*Androlaelaps* sp. *Laelaps* sp. e *Amblyomma* sp.) e *Oryzomys megacephalus* (*A. cajennense*). A espécie *Calomys callosus* não apresentou ectoparasito. A ordem Didelphimorphia apresentou os seguintes resultados: *Didelphis marsupialis* (*Androlaelaps* sp., *Laelaps* sp. e larvas de diptera Cyclorrhapha); *Gracilinanus* sp. (*Laelaps* sp. e larvas de diptera Cyclorrhapha), *Monodelphis domestica* (*Polygenis* (*Polygenis*), *Cummingsia* sp., *Amblyomma* sp. e *Androlaelaps* sp.). Não se observou infestação em *Marmosa* sp. e *Thylamys* sp. Houve infestação em 56% dos hospedeiros capturados, sendo 82% e 44% em roedores e marsupiais, respectivamente. Os ácaros da família Laelapidae foram os que apresentaram maior diversidade de hospedeiros e gêneros. Dos mamíferos amostrados, com exceção de *O. megacephalus*, que estava infestado somente pelo gênero *Amblyomma*, os demais apresentaram infestação por mais de um gênero de parasito, sendo *M. domestica* o hospedeiro mais infestado. A maior frequência de ectoparasitos foi de *Androlaelaps* sp.

Estudos realizados por Linardi et al. (1984) com roedores domésticos da região urbana de Belo Horizonte, foram capturados 950 *Rattus norvegicus* as principais espécies de ectoparasitas coletados foram: *Xenopsylla cheopis*, *Ctenocephalide felis felis*, *Polyplax spinulosa*, *Lactaps nuttalli*, *Echinolaelaps echidninus* e *Atricholaelaps glasgowi*. 69% dos roedores estavam infestados por ácaros, quase duas vezes mais do que as infestações por pulgas e piolhos conjuntamente (39%). *Lactaps nuttalli* foi a espécie mais numerosa e apresentaram maior índice de infestação, 55%.

Outro estudo realizado por Linardi et al. (1991a) sobre ectoparasitas de pequenos mamíferos da Ilha de Maracá, Roraima, foram colecionados 1774 retirados de 51 roedores e 3 marsupiais. Destes os seguintes grupos taxonômicos foram coletados: Acari Ixodídes, Acari Mesostigmata, Anoplura, Mallophaga e Siphonaptera. Apesar da quantidade de ácaros capturados ser bastante significativa apenas 7 ninfas de *Amblyomma* sp foi coletada.

Estudos realizados por Carvalho et al. (2001), em 600 pequenos roedores em áreas focos de peste bubônica na Serra dos Órgãos no Estado do Rio de Janeiro coletaram 11 espécies diferentes de pulgas e não refere ao encontro de carrapatos.

Estudos da fauna de ectoparasitos e besouros *Amblyopinini* associada a quatro espécies de pequenos mamíferos da Mata Atlântica da Ilha Grande, localizada no sul do

Estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil, analisando em que extensão os ectoparasitos seriam específicos de cada região do corpo do hospedeiro. Durante o estudo capturamos um total de 90 roedores e somente uma larva de *Amblyomma* sp foi coletada. Os dados mostraram que os ectoparasitos e os *Amblyopinini* encontrados vivendo nos hospedeiros roedores da Ilha Grande tiveram preferência por algumas áreas específicas do corpo do hospedeiro. Contudo, algumas espécies de ectoparasitos podem sobrepor em alguns sítios que utilizam, aparentemente devido à limitação de acesso a esses sítios pelos hospedeiros, reduzindo sua remoção e aumentando a chance de que ali ocorram (BITTENCOURT; ROCHA, 2002).

Segundo Nieri-Bastos (2004) Dezesseis espécies de ectoparasitos foram coletadas sobre 195 roedores, entre Fevereiro de 2000 e Janeiro de 2001, no Parque Estadual da Cantareira, que compreende os municípios de Caieiras, Mairiporã e Guarulhos, Estado de São Paulo, Brasil. Cinquenta e três por cento dos roedores capturados estavam infestados, e as maiores prevalências foram observadas para *Gigantolaelaps gilmorei* e *G. oudemansi* em *Oryzomys russatus*; *G. wolffsohni*, *Laelaps paulistanensis* e *M. parvispinosus* em *Oligoryzomys* sp. Em relação as pulgas, *Polygenis (Neopolygenis) atopus* foi a mais prevalente, infestando *O. russatus*. Os maiores índices de especificidade foram para *Eubrachylaelaps rotundus/Akodon* sp., *G. gilmorei* e *G. oudemansi/ O. russatus* e *Laelaps navasi/Juliomys pictipes*. A intensidade média de infestação está relacionada ao índice de especificidade, e somente foi significativa para *Brucepattersonius* sp. e *O. russatus* ($p < 0,05$). Um novo registro de localidade foi assinalado para *L. navasi*, e as seguintes espécies, *Craneopsylla minerva minerva* e *Polygenis (N.) pradoi* foram encontradas pela primeira vez em *Blarinomys breviceps*; tanto quanto *A. fahrenheitzi*, *E. rotundus*, *G. wolffsohni*, *M. parvispinosus*, *C. minerva* e *P. atopus* em *Brucepattersonius* sp. e *A. fahrenheitzi*, *E. rotundus*, *G. gilmorei*, *G. oudemansi*, *Ixodes loricatus*, *L. navasi*, *L. paulistanensis*, *M. parvispinosus* e *P. atopus* em *J. pictipes*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Áreas de Estudo

A região administrativa de Campinas é composta por 90 municípios. Esta região é considerada endêmica para a febre maculosa desde 1985, quando foram registrados os primeiros casos ocorridos no município de Pedreira e no ano seguinte no de Jaguariúna.

Para o presente estudo, foram selecionados os municípios de Jaguariúna, Pedreira e Piracicaba. A escolha destes municípios se deu em função do registro de recentes casos em seres humanos.

3.2 Características Geográficas dos Municípios Escolhidos

O município de Piracicaba localiza-se na mesorregião de Piracicaba e microrregião de Piracicaba, (Latitude 22°43'30"S e Longitude 47°38'56"W), abrangendo uma área de aproximadamente 1.369,511Km² e altitude de 547 metros, possui clima tropical de altitude Cwa. Municípios limítrofes: Rio Claro, Limeira, Santa Barbara d'Oeste, Laranjal Paulista, Iracemápolis, Anhembi, São Pedro, Charqueada, Rio das Pedras, Tiete, Capivari, Conchas, Santa Maria da Serra, Ipeúna e Saltinho.

O município de Jaguariúna localiza-se na região centro-leste do Estado de São Paulo, (Latitude 22°42'24"S e Longitude 47°59'50"W), abrangendo uma área de aproximadamente 140km², com altitude máxima de 732 metros e mínima de 560m.

Os limites municipais de Jaguariúna são: ao norte Holambra e Santo Antonio de Posse, sul Campinas, leste Pedreira e oeste Paulínia.

A região está situada em pleno contato de duas zonas geomorfológicas: o Planalto Atlântico, na parte oriental e a Depressão Periférica (Bacia do Paraná) na parte ocidental. Na parte correspondente ao Planalto Atlântico, o relevo consiste de morretes alongados paralelos, com topos arredondados e perfil convexo. Neste município foram escolhidas três localidades para coleta dos pequenos roedores todas como prováveis locais de infecção humana: 1) Fazenda Santa Júlia; 2) Recanto do Ágape; 3) Sítio Rancho da Terra.

O município de Pedreira é um município que localiza-se encravado na zona Cristalina do Norte do Estado de São Paulo, na Micro Região da Estâncias Hidrominerais Paulistas a uma latitude 22°44'31" sul e a uma longitude 46°54'05" oeste, estando a uma altitude de 584 metros à altura do mar. Municípios limítrofes: Amparo, Jaguariúna, Morungaba, Santo Antônio de Posse e Campinas.

Possui topografia irregular, com inúmeras montanhas e seu solo é fértil. Clima seco, ligeiramente úmido no inverno, entrecortada pelo Rio Jaguari já não tão piscoso como outrora, mas ainda majestoso em sua beleza, oferecendo belas ilhas e corredeiras. Neste município foi escolhida três localidades para coleta dos pequenos roedores todas como prováveis locais de infecção humana: 1) Fazenda São Nilo; 2) Nadir Figueiredo.

Segundo a classificação de Köppen a região possui o clima tipo Cwa mesotérmico, com verões quentes e estação seca nos meses de maio a setembro com apenas 26% da

precipitação anual, apresentando no mês mais frio média mensal inferior a 18°C e superior a 3°C. Os meses chuvosos se estendem de outubro a abril, período que caem 74% das chuvas anuais. Durante o verão observa-se precipitações mais intensas e o maior número de dias com ocorrências de chuvas. O verão é o período de maior risco de intensificação das enxurradas e, conseqüentemente, dos processos erosivos. A vegetação original era representada pela mata latifoliada tropical, são raros os remanescentes.

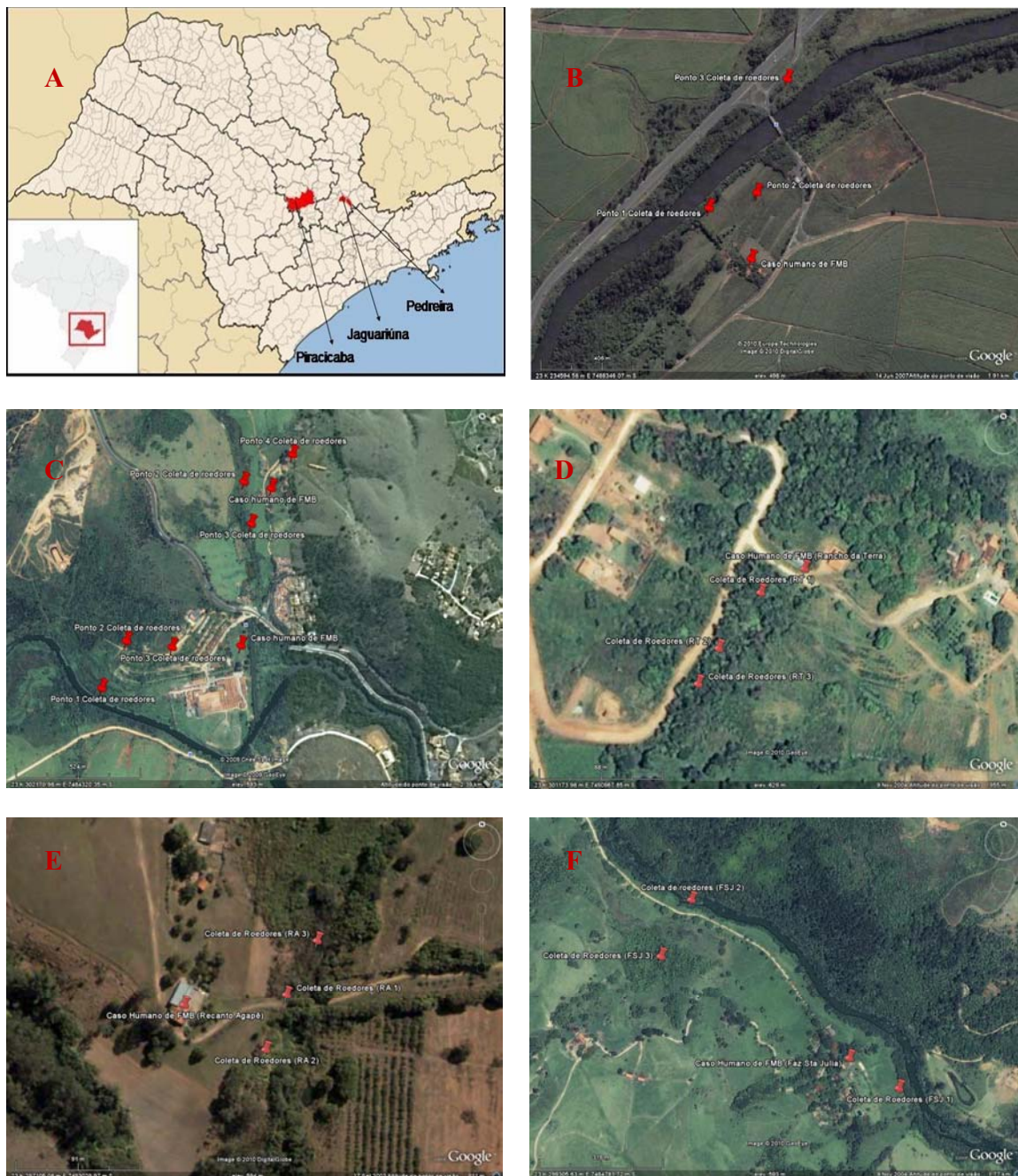


Figura 1. A. Mapa do estado de São Paulo, Brasil, mostrando em destaque de vermelho os municípios Jaguariúna, Pedreira e Piracicaba; B. Imagem de satélite do Sítio Monte Alegre, Piracicaba; C) Imagem de satélite referentes às localidades: Fazenda Monte Nilo e Nadir Figueiredo – Município de Pedreira.; D. Imagem de satélite do Rancho da Terra, Jaguariúna; Imagem de satélite do Recanto do Agape e F) Imagem de satélite da Fazenda Santa Júlia, Município de Jaguariúna.

3.3 Coletas dos Pequenos Roedores

As coletas dos pequenos roedores foram realizadas de acordo com as medidas de biossegurança nível três, com o uso de aventais descartáveis, luvas e botas de borracha, óculos protetores, luvas cirúrgicas e aparelhos de filtragem de ar com filtros HEPA, associado a máscara de pressão positiva. Tal medida foi tomada para evitar acidentes envolvendo os profissionais que desenvolveram esta atividade devido ao risco do hantavirus que são altamente patogênicos aos seres humanos e transmissíveis por aerossóis de partículas virais formados a partir de excretas de roedores contaminados.

Após concessão da licença pelo IBAMA, a captura dos pequenos roedores foi realizada segundo a técnica descrita por Mills et al. (1998). As coletas de campo ocorreram no período de maio a setembro nos anos de 2006 e 2007 nas áreas acima descritas, em ambientes próximos da mata ciliar. Para a captura dos animais utilizou-se cem armadilhas tipo *Sharm* distribuídas em linhas levando em conta o tipo de vegetação desta área e instaladas no período da tarde. As iscas utilizadas foram feitas com Amendocrem[®] misturado com aveia em flocos. As armadilhas foram recolhidas na manhã do dia seguinte. Para o recolhimento destas armadilhas utilizou-se obrigatoriamente luvas de borracha resistentes. No momento da retirada observava-se primeiro se armadilhas estavam desarmadas. Então, eram levemente abertas longe do rosto do capturador para verificar a presença do roedor na armadilha. As que estavam com roedores, foram obrigatoriamente colocadas em sacos plásticos e transportadas na carroceria dos veículos para evitar a inalação do vírus. As armadilhas sem roedores eram guardadas para serem novamente armadas no final da tarde.

O processamento dos roedores no campo foi realizado em área segura, delimitada por cordas e sinalizada como área infectada (para evitar o ingresso de curiosos). Os animais foram processados ao ar livre, a fim de evitar a concentração de partículas virais, beneficiando-se também da ação viricida dos raios solares e dentro da área de captura, pois não podiam ser levados além dos limites da área estudada, para evitar a disseminação do vírus.

Os sacos com roedores coletados só foram abertos após toda equipe de trabalho estar paramentada com os equipamentos de segurança já descritos. Após a retirada do roedor, as armadilhas foram colocadas em balde contendo desinfetante, ficando submersas por 30 minutos, lavadas em água corrente e secas ao sol.

Os roedores capturados foram anestesiados com substância volátil (algodão embebido em éter sulfúrico comercial), dentro de um saco plástico transparente de alta resistência e contido manualmente. Em seguida houve coleta de sangue com o auxílio de pipeta Pasteur, através da punção da artéria ocular no forame intra-orbitário.

As amostras foram colocadas para um “ependorf” para obtenção de soro a partir da formação e retração do coágulo e encaminhadas ao laboratório da SUCEN sendo armazenadas a temperatura -20°C até a realização de provas sorológicas.

Após a coleta do sangue, os roedores foram eutanasiados pela ruptura de medula no nível cervical e constatando a sua morte, foi feita biometria para auxiliar na identificação da espécie destes roedores.

Realizou-se então a necrópsia com a utilização de pinças e tesouras, retirando a pele da região abdominal e coletando-se fragmentos de baço e fígado acondicionando-os em criotubos e congelados em nitrogênio líquido para realização do PCR's.

Os roedores foram etiquetados e conservados em sacos plásticos dentro de um galão com solução de formol a 10% e encaminhados para o Instituto Adolfo Lutz onde foram identificados e depositados na coleção deste Instituto.

Descarte do material utilizado, incluindo papel, sacos de plástico, embalagens, luvas e aventais cirúrgicos, material perfuro-cortante, foram colocados em saco plástico duplo e incinerados com álcool em uma cova de 1 metro de profundidade, distante de habitações humanas e criações de animais. Após a queima total, a cova foi preenchida com terra cobrindo totalmente as cinzas.



Figura 2. Sequência dos procedimentos realizados na pesquisa de campo com os pequenos roedores. A – Anestesia; B – Coleta de sangue; C – Deslocamento cervical; D – Pesagem; E – Biometria; F – Necropsia e retirada do baço.