

BEPA

Boletim Epidemiológico Paulista

PUBLICAÇÃO MENSAL SOBRE AGRAVOS À SAÚDE PÚBLICA

ISSN 1806-4272

Volume 4 Número 40

abril de 2007

Nesta Edição

Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública ... 2
Wildlife reservoirs of rabies virus: a new challenge to a public health

Aspectos epidemiológicos da síndrome cardiopulmonar por hantavírus nas Américas 9
Epidemiological aspects of cardiopulmonar syndrome of hantavirus in the Américas

Introdução da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas no Instituto Adolfo Lutz 24
Introduction of conventional and real time PCR for laboratory diagnostic of bacterial meningitis at Instituto Adolpho Lutz

Instruções aos Autores 28
Author's Instructions



O Boletim Epidemiológico Paulista é uma publicação mensal da Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.
Av. Dr. Arnaldo, 351 - 1º andar, sl. 135
CEP: 01246-902 - Brasil
Tel.: 55(11) 3066-8823 e 3066-8825
bepa@saude.sp.gov.br

Expediente

Coordenadora
Clélia Maria Sarmento de Souza Aranda

Editora Geral
Clélia Maria Sarmento de Souza Aranda

Editores Associados
Affonso Viviane Junior – SUCEN/SP
Cilmara Polido Garcia – CVE/CCD/SES-SP
Fernando Fiuza – Instituto Clemente Ferreira/CCD/SES-SP
José Carlos do Carmo – CEREST/CCD/SES-SP
Marcos da Cunha Lopes Virmond – ILSL/CCD/SES-SP
Maria Clara Gianna – CRT/DST/Aids/CCD/SES-SP
Maria Cristina Megid – CVS/CCD/SES-SP
Marta Lopes Salomão – IAL/CCD/SES-SP
Neide Yume Takaoka – Instituto Pasteur/CCD/SES-SP

Consultores Científicos

Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza – FM/Unesp/Botucatu - SP
Cristiano Corrêa de Azevedo Marques – CCD/SES-SP
Eliseu Alves Waldman – FSP/USP/SP
José Cássio de Moraes – FCM-SC/SP
Luiz Eduardo Batista – CCD/SES-SP
Luiz Jacintho da Silva – FM/Unicamp
Maria Bernadete de Paula Eduardo – CCD/SES-SP
Vilma Pinheiro Gawyszewsk – CCD/SES-SP

Coordenação Editorial

Cecília Abdalla
Cláudia Malinverni
Letícia Maria de Campos
Sylia Rehder

Núcleo de Comunicação – GTI

Projeto gráfico/editoração eletrônica

Marcos Rosado – Nive/CVE
Zilda M Souza – Nive/CVE

Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública

Wildlife reservoirs of rabies virus: a new challenge to a public health

Ivanete Kotait, Maria Luiza Carrieri, Pedro Carnieli Júnior, Juliana Galera Castilho, Rafael de Novaes Oliveira, Carla Isabel Macedo, Karin Corrêa Scheffer Ferreira, Samira M. Achkar.

Instituto Pasteur – IP
Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD
Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – SES–SP

Resumo

Estima-se que 55.000 óbitos humanos sejam causados pela raiva transmitida pelo cão, anualmente, em especial na Ásia e África. Na América Latina, onde a raiva canina era endêmica até 1980, houve, recentemente, uma redução do número de casos em cães e, conseqüentemente, em humanos. Com o desenvolvimento do Plano de Ação para Eliminação da Raiva Urbana, a raiva em animais silvestres assumiu maior importância, especialmente porque nos anos 2004-2005 o morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) passou a ser o principal transmissor da raiva humana no continente (68%). Além das três espécies de morcegos hematófagos nas quais há relatos de isolamento do vírus da raiva, 33 outras espécies de morcegos também já foram infectadas e identificadas com o mesmo vírus. Juntamente com os morcegos (Ordem *Chiroptera*), os canídeos (Ordem *Carnivora*) são considerados os principais reservatórios silvestres do vírus da raiva. No Nordeste do Brasil a doença tem sido cada vez mais freqüente em *Cerdocyon thous* (cachorro do mato) e há um outro ciclo epidemiológico da raiva em *Callithrix jacchus* (sagüi do tufo branco), espécie em que a distribuição da doença é desconhecida. Os autores descrevem características da doença em quirópteros e carnívoros, estratégias de controle e ressaltam a importância dos estudos antigênicos e genéticos como instrumento da vigilância epidemiológica.

Palavras-chave: raiva; reservatórios silvestres; morcegos; canídeos; vigilância epidemiológica.

Abstract: Human mortality from endemic canine rabies is estimated to be 55.000 deaths per year, especially in Asia and Africa. In Latin America the canine rabies was endemic until 1980, but recently had a frequency reduction of canine rabies virus and consequently in human. With the development of “Plan of Action for the Elimination of Urban Rabies” the wildlife animals has become epidemiologically important and can be a new challenge. The most common transmitters of rabies to humans were a vampire-bat *Desmodus rotundus* in the period 2004-2005 (68%). Besides of the three species of vampire-bats, whose the rabies virus were isolated, there are 33 other species of non-hematophagous-bat that were related infected with the same virus. Bats (order *Chiroptera*) and canids (order *Carnivora*) are recognized as wildlife reservoirs. In Northeastern Brazil, the disease have had high frequency in *Cerdocyon thous* (crab-eating fox) in parallel with another epidemi-

ological cycle rabies virus in *Callithrix jacchus* (marmoset) which the disease distribution is unknown. The authors describe the disease's characteristics in bats and canids, the control strategies and emphasize the importance of antigenic and genetics studies as tool of epidemiological surveillance

Key words: rabies; wildlife reservoirs; bats; canids; surveillance. **Introdução**

A raiva é uma encefalite aguda, progressiva, causada por um RNA vírus da família *Rhabdoviridae*, do gênero *Lyssavirus*, que possui, atualmente, 7 genótipos. No Brasil apenas o genótipo 1 (*Rabies virus* – RABV) foi identificado^{1,2}. Esta zoonose é transmitida ao homem, principalmente, pela mordedura de animais infectados.

Outras vias de transmissão da raiva são raras, embora tenham de ser consideradas em situações de investigação epidemiológica de caso ou surto. A exposição oral, por exemplo, pode resultar em infecção, porém com baixa eficiência³.

Durante o período de incubação, o vírus pode permanecer no ponto de inoculação, replicando-se nas fibras musculares, antes de atingir as células nervosas e os nervos periféricos. Os vírus seguem um trajeto centrípeto, em fluxo axoplasmático retrógrado, célula a célula, através das junções sinápticas, até alcançar o sistema nervoso central e, depois, seguem a direção centrífuga, disseminando-se por diferentes órgãos, inclusive as glândulas salivares, sendo então eliminados pela saliva^{3,4}.

De acordo com dados recentes, fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 55.000 óbitos humanos sejam registrados, anualmente, no mundo, sendo 99% deles na Ásia e África, e em menor escala, na América Latina, e o cão, ainda, o seu principal transmissor. Morre a cada 15 minutos uma pessoa infectada pelo vírus da raiva, e cerca de 40% são crianças com idade inferior a 15 anos^{4,5,6}.

Alguns países da América Latina, região na qual a raiva canina até 1980 era endêmica, conseguiram, através de ações estratégicas, modificar este panorama, com uma importante redução dos casos caninos e, conseqüentemente, humanos^{3,7,8}.

Avalia-se que, em 2004, o Governo do Brasil tenha gasto US\$ 28 milhões na profilaxia e controle da raiva, apenas com vacinas de uso humano e para cães, imunoglobulinas, diagnóstico laboratorial, treinamento de recursos humanos e campanhas de vacinação de cães. Não estão incluídas nesse valor as despesas relacionadas à prevenção

da raiva transmitida pelos morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) a humanos e herbívoros, nem mesmo de tratamentos humanos ou, ainda, gastos indiretos⁵.

Este fato ocorreu no Brasil e permitiu ao Programa Nacional de Controle da Raiva, coordenado pelo Ministério da Saúde, bem como aos programas estaduais, um indispensável novo olhar para as questões da raiva silvestre, particularmente dos canídeos e morcegos não-hematófagos em áreas urbanas e de transição, sem que se abandone a sistemática vigilância epidemiológica da raiva em cães, desigualmente implantada no País.

A raiva silvestre assumiu maior importância também devido aos hábitos sinantrópicos destes animais, que alcançaram as áreas urbanas e de transição, em conseqüência da maior oferta de alimentos existente nestas áreas e ao impacto ambiental provocado pela ação humana em seus habitats naturais.

Principais reservatórios silvestres do vírus da raiva no Brasil

A Classe *Mammalia* possui cerca de 4.650 espécies, sendo todos susceptíveis ao vírus da raiva porém, como reservatórios de importância em saúde pública, são mencionados duas ordens: *Carnivora* e *Chiroptera*.

Entre as 1.113 espécies de quirópteros existentes no mundo, são encontrados no Brasil, atualmente, 165 espécies entre os insetívoros, frugívoros e hematófagos^{9,10}.

Na ordem *Carnivora*, destacam-se as famílias: *Canidae* (cães, raposas, "raccoon-dog", cachorro do mato, "raposinhas" etc.), *Procyonidae* (guaxinim); *Mustelidae* (gambá) e *Herpestidae* (mangosta)⁷.

A epidemiologia da raiva em morcegos e canídeos deve merecer atenção crescente das instituições governamentais e pesquisadores, visando introduzir estratégias que permitam limitar a difusão da raiva entre os animais silvestres e, se possível, eliminar a raiva nestes importantes reservatórios, es-

pécie por espécie, com o estabelecimento de uma vigilância epidemiológica coordenada e, cada vez mais, com procedimentos de diagnóstico laboratorial (antigênicos e genéticos) que permitam a realização de estudos integrados de genética e ecologia, para o conhecimento da dinâmica da raiva no meio silvestre.

É necessário ressaltar que as ações de controle da raiva em representantes destas ordens possuem significantes diferenças. Em relação aos morcegos (ordem *Chiroptera*), apenas os morcegos vampiros comuns (*Desmodus rotundus*) são passíveis de controle, sendo que as demais espécies são protegidas por lei e somente são recomendadas ações de manejo.

Em animais da ordem *Carnivora* não se obtêm controle da raiva apenas através de ações que provoquem diminuição da densidade populacional, e, sim, através do uso concomitante da vacinação, sendo este um dos temas mais estudados, atualmente, com grandes avanços na pesquisa de novas tecnologias de produção de vacinas orais.

Há algumas características dos hospedeiros e da raiva que favorecem a perpetuação do vírus da raiva, entre as quais podem ser citadas: os hospedeiros se apresentam com alta densidade populacional e intensas interações sociais; possuem alta capacidade de deslocamento e a doença se caracteriza por um longo período de incubação, em relação às outras viroses.

Os principais reservatórios silvestres do vírus da raiva no Brasil (*Desmodus rotundus*, *Cerdocyon thous*, *Callithrix jacchus* e 35 outras espécies de morcegos) determinam quatro situações de maior relevância para a saúde pública, na atualidade, com respeito à raiva silvestre, que serão comentadas a seguir.

Raiva em morcegos hematófagos

Foi Antonio Carini, médico italiano, então diretor do Instituto Pasteur, que em 1911 admitiu, pela primeira vez, a hipótese de os morcegos hematófagos atuarem como transmissores da raiva, em um surto de raiva bovina e eqüina que acometeu 4.000 animais em Santa Catarina¹¹.

Episódios de raiva humana continuaram sendo relatados em muitos países da América Latina, tais como México, Peru, Venezuela e Brasil⁴.

Nos anos 2004-2005, os morcegos hematófagos foram os principais transmissores de raiva humana na América Latina, com 46 e 52 casos, respectivamente. O Brasil foi o país no qual o número de casos foi maior (64)¹². A Tabela 1 mostra a ocorrência de óbitos humanos, por país e ano, na região Amazônica.

Tabela 1. Raiva humana transmitida por morcegos hematófagos na Região Amazônica (2004-2005).

PAÍS	2004	2005	TOTAL
Brasil	22	42	64
Equador	0	2	2
Peru	8	7	15
Colômbia	14	0	14
Venezuela	2	0	2
Bolívia	0	1	1
TOTAL	46	52	98

Fonte: SVS/MS e Panaftosa/OPS.

Em alguns municípios desta região, muitas pessoas vivem em condições de extrema pobreza, em moradias vulneráveis e áreas a população animal é pequena¹³. Nessas áreas, os morcegos hematófagos, que necessitam se alimentar diariamente, embora tenham preferência por sangue de bovinos, suínos e eqüinos, utilizam humanos, especialmente crianças, como sua principal fonte de alimento.

Este fato vem ocorrendo em função da acentuada interferência do homem no meio ambiente, migrando para áreas inexploradas, alterando processos produtivos e provocando modificações no equilíbrio ecológico.

Além da raiva humana transmitida pelos morcegos hematófagos, há grandes prejuízos econômicos causados na produção agropecuária, diretos e indiretos, e a raiva dos animais de criação (especialmente bovinos e eqüinos) vem ocorrendo em todo o País. Em 2001, os prejuízos causados pela raiva dos herbívoros, no Brasil, foram estimados em US\$ 37,5 milhões¹⁴, merecendo destaque algumas regiões, tais como a confluência dos Estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás e de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, face às suas condições topográficas e disponibilidade de abrigos naturais e artificiais.

O controle da densidade populacional destes animais deve ser realizado com a aplicação de anticoagulantes ao redor das mordeduras dos animais atacados e no dorso de morcegos hematófagos capturados pelas equipes de órgãos oficiais. Com base no comportamento destes animais, de hábitos gregários, que em contatos mantidos entre eles disseminam a pasta para os outros espécimes da colônia, sendo esta a principal estratégia de controle populacional do *Desmodus rotundus*.

O Estado de São Paulo tem, hoje, uma situação de controle da raiva dos herbívoros, em função do trabalho contínuo e sistemático que vem sendo realizado pela Coordenadoria de Defesa Agropecuária da Secretaria de Agricultura e Abastecimento*.

Raiva em morcegos não-hematófagos

A raiva em morcegos não-hematófagos foi inicialmente relatada na Flórida (EUA), em 1953, quando um menino de 7 anos foi atacado por um morcego insetívoro. Após este fato, inúmeros casos de raiva humana vêm sendo descritos na América do Norte, tendo como fonte de infecção morcegos insetívoros, particularmente *Lasionycteris noctivagans* e *Pipistrelus subflavus*^{4,5,15}. Merece destaque o fato de a maioria dos casos humanos de raiva transmitida por morcegos insetívoros não ter histórico de exposição a estes animais. Casos de raiva humana nos quais foram identificadas variantes próprias de morcegos, sem evidências de mordeduras, também foram relatados em diversos outros países da Europa e do continente americano¹⁶.

Estudos laboratoriais realizados em distintas regiões dos Estados Unidos relatam índice de positividade que varia de 1% a 10%, sendo que a probabilidade de um morcego agressor ser positivo para raiva é mais de duas vezes superior à probabilidade de morcegos não-agressores¹⁶.

Na América do Sul, pesquisas realizadas no Chile, Argentina e Brasil relatam que os seguintes gêneros/espécies têm maior importância epidemiológica: *Tadarida brasiliensis*, *Myotis sp*, *Lasiurus sp*, *Artibeus sp*^{2,17,18}.

Pesquisas recentes, realizadas visando isolar pelas técnicas de inoculação em camundongos e/ou células ou identificar vírus pela RT-PCR, em órgãos e tecidos não-nervosos de morcegos (hematófagos e não-hematófagos), inoculados experimentalmente ou em casos naturais, trouxeram importante contribuição para estudos da patogenia da raiva em nestes animais^{19,20}.

A Figura 1 mostra a variação do número de caso em cães, gatos e morcegos, no período entre 1993 a 2005, segundo dados da Coordenação Estadual do Programa de Controle da Raiva. Cerca de 90% dos casos de raiva em morcegos no Estado de São Paulo ocorreram em áreas urbanas, que hoje oferecem condições propícias para sua sobrevivência, tais como alimentos (insetos e frutas, folhas e sementes) e abrigos, processo que ocorre simultaneamente à fragmentação das florestas, que provoca o deslocamento dos animais e representa uma ameaça de extinção para algumas espécies.

A verificação de um número cada vez maior de casos de raiva em morcegos, independentemente de o seu hábito alimentar, estudo este iniciado em São Paulo e que tem se confirmado em outros Estados, tem comprovado a importância dos morcegos das diferentes espécies como reservatório do vírus da raiva em nosso meio.

Quadro 1. Espécies de morcegos identificados com o vírus da raiva no Brasil, 2007.

Número	Família	Subfamília	Gênero	Espécie	Hábito Alimentar
01	Molossidae	-	Molossus	M. molossus	Insetívoro
02	Molossidae	-	Molossus	M. rufus	Insetívoro
03	Molossidae	-	Eumops	E. auripendulus	Insetívoro
04	Molossidae	-	Eumops	E. glaucinus	Insetívoro
05	Molossidae	-	Eumops	E. perotis	Insetívoro
06	Molossidae	-	Nyctinomops	N. laticaudatus	Insetívoro
07	Molossidae	-	Nyctinomops	N. macrotis	Insetívoro
08	Molossidae	-	Tadarida	T. brasiliensis	Insetívoro
09	Molossidae	-	Cynomops	C. abrasus	Insetívoro
10	Vespertilionidae	-	Eptesicus	E. diminutus	Insetívoro
11	Vespertilionidae	-	Eptesicus	E. fernalis	Insetívoro
12	Vespertilionidae	-	Lasiurus	L. borealis	Insetívoro
13	Vespertilionidae	-	Lasiurus	L. ega	Insetívoro
14	Vespertilionidae	-	Lasiurus	L. cinereus	Insetívoro
15	Vespertilionidae	-	Histiotes	H. velatus	Insetívoro
16	Vespertilionidae	-	Myotis	M. albescens	Insetívoro
17	Vespertilionidae	-	Myotis	M. nigricans	Insetívoro
18	Phyllostomidae	Desmodontinae	Desmodus	D. rotundus	Hematófago
19	Phyllostomidae	Desmodontinae	Diaemus	D. youngi	Hematófago
20	Phyllostomidae	Desmodontinae	Diphylla	D. ecaudata	Hematófago
21	Phyllostomidae	Glossophagine	Anoura	A. geoffroyi	Neectarívoro
22	Phyllostomidae	Glossophagine	Anoura	A. caudifer	Neectarívoro
23	Phyllostomidae	Glossophagine	Glossophaga	G. soricina	Neectarívoro
24	Phyllostomidae	Phyllostominae	Chrotopterus	C. auritus	Carnívoro e Insetívoro
25	Phyllostomidae	Phyllostominae	Lonchorhina	L. aurita	Insetívoro
26	Phyllostomidae	Phyllostominae	Micronycteris	M. megalotis	Carnívoro e Insetívoro
27	Phyllostomidae	Phyllostominae	Phyllostomus	P. hastatus	Onívoro
28	Phyllostomidae	Phyllostominae	Tonatia	T. brasiliensis	Carnívoro e Insetívoro
29	Phyllostomidae	Phyllostominae	Trachops	T. cirrhosus	Onívoro
30	Phyllostomidae	Carollinae	Carollia	C. perspicillata	Frugívoro e Insetívoro
31	Phyllostomidae	Stenodermatinae	Artibeus	A. jamaicensis	Frugívoro
32	Phyllostomidae	Stenodermatinae	Artibeus	A. lituratus	Frugívoro
33	Phyllostomidae	Stenodermatinae	Artibeus	A. planirostris	Frugívoro
34	Phyllostomidae	Stenodermatinae	Artibeus	A. fimbriatus	Frugívoro
35	Phyllostomidae	Stenodermatinae	Platyrrhinus	P. lineatus	Frugívoro
36	Phyllostomidae	Stenodermatinae	Uroderma	U. bilobatum	Frugívoro

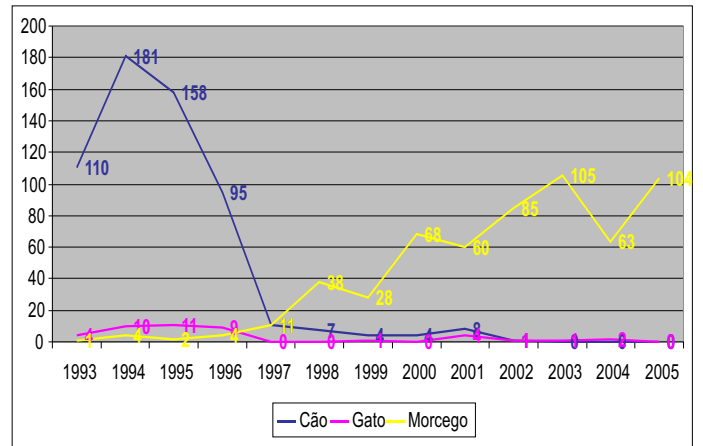


Figura 1. Número de casos de raiva animal no Estado de São Paulo, no período de 1993-2005, São Paulo, 2006.

À semelhança do que ocorre nos Estados Unidos, em São Paulo, nos últimos cinco anos, o número de casos de raiva em gatos, cuja tipificação antigênica e genética revela variantes de morcegos, é maior do que em cães. As duas variantes principais são *Desmodus rotundus* (Variante Antigênica 3 AgV3) e do *Tadarida brasiliensis* (AgV 4)²¹.

A AgV3 tem sido relatada em um grande número de espécies hospedeiras, assim como a AgV4 e a AgV6 e outras com perfil de reação não compatível com os padrões definidos pelo painel de anticorpos monoclonais, cedido pelo do CDC de Atlanta (EUA), para estudos de isolados de vírus da raiva no continente americano. Estes estudos antigênicos têm sido confirmados pelo Laboratório de Diagnóstico do Instituto Pasteur e revelam a ocorrência de "spillover" de variantes de morcegos em cães e gatos e a transmissão secundária para humanos (morcego – gato – humano)²², tendo esta última sido relatada, também, na Costa Rica²³.

Raiva em canídeos

Até a idade média raramente eram descritos surtos de raiva. A maioria dos casos era de ataques esporádicos de cães, mas já eram observados casos em animais silvestres, como lobos e raposas.

Na França, em 1271, foi descrito o primeiro surto de raiva em uma população residente em uma vila, que foi atacada por lobos raivosos. Também na França, em 1803, ocorreu um surto em que centenas de raposas morreram e muitas pessoas e animais foram agredidos por elas. Enquanto as referências mais antigas citam apenas os carnívoros, a raiva em morcegos parece ser tão antiga ou até mais do que em outros mamíferos. A partir de 1940, a raiva na Europa teve suas características epidemiológicas alteradas. O cão deixou de ser a espécie de maior importância epidemiológica, *status* transferido para a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*); mais recentemente, os *raccoon-dogs* (*Nycterontes procyonoides*) passaram a representar a segunda espécie em importância para a raiva no continente europeu²⁴.

No Brasil, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS), os canídeos silvestres foram responsáveis por 7,9% dos 165 óbitos humanos por raiva, no período de 1986-2006**.

Recentemente, estudos realizados por profissionais do Instituto Pasteur, do Ministério e das Secretarias Estaduais de Saúde do Nordeste verificaram a existência de diferentes populações de vírus da raiva espécie-específica na região, embora a identificação das espécies tenha sido a

apropriada, segundo critérios morfológicos²⁴ e não genética, como é o desejado.

Estes autores sugerem que o principal reservatório do vírus da raiva na região Nordeste seja o cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), embora os outros autores tenham relatado que o papel mais importante era do *Lycalopex vetulus* = *Pseudolopex vetulus*^{25,26}.

Estas duas espécies, que apresentam relações simpátricas em algumas regiões e o uso de nomenclatura comum e regional, têm deixado mais dúvidas na identificação das espécies reservatórios do vírus da raiva.

A distribuição da raiva em canídeos silvestres, no Brasil, está demonstrada na Figura 2.



Figura 2. Mapa do Brasil (esquerda) e a Região Nordeste (direita) mostrando os Estados onde se concentram casos de raiva em canídeos silvestres. BA = Estado da Bahia; SE = Estado de Sergipe; AL = Estado de Alagoas; PE = Estado de Pernambuco; PB = Estado da Paraíba; PI = Estado do Piauí e MA = Estado do Maranhão.

A ocorrência de raiva em canídeos silvestres, principalmente da espécie *Cerdocyon thous* (cachorro do mato), nos Estados do Nordeste, bem como de casos humanos transmitidos por estes animais, sugerem um ciclo de raiva entre cães domésticos e selvagens, de grande importância epidemiológica. Este fato tem permitido a perpetuação do vírus da raiva na região, com possibilidade de reintrodução da doença em áreas urbanas que estavam com a raiva em animais domésticos sob controle.

Os hábitos sinantrópicos de algumas espécies de morcegos e dos cachorros do mato, que são alterados por efeitos sazonais, com mudanças nas taxas de contato, afetando a dispersão animal, e as tendências reprodutivas ou táticas de busca de alimento também favorecem a perpetuação da raiva em uma região.

Estudos antigênicos e genéticos realizados sugerem que os vírus circulantes na região Nordeste tenham uma origem comum e que houve um "spillover", dos canídeos domésticos para os silvestres.

**Secretaria de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde, Brasil, 2007.

Raiva em primatas não-humanos (*Callithrix jacchus*)

A manutenção de um ciclo de raiva entre os sagüis de tufo branco, *Callithrix jacchus*, no Ceará, com casos também relatados no Piauí, que, eventualmente, pode ser transmitida a humanos, é um outro tema importante para as autoridades regionais de saúde pública e que necessita de maiores estudos, tendo em vista o desconhecimento da real da distribuição da doença nestes animais. No final da década de 1980, já haviam sido registrados casos de raiva nesta espécie de primata no Estado do Rio Grande do Norte.

Estudos antigênicos e genéticos realizados com os isolados de vírus da raiva nessa espécie de primata revelaram que a variante encontrada é a mais divergente já isolada no Brasil²⁷.

Ao se estudar a raiva em silvestres, particularmente em *Chiroptera* e *Carnivora*, algumas semelhanças e diferenças devem ser destacadas²⁸:

Semelhanças

1. A susceptibilidade, a via de transmissão principal (mordedura) e os aspectos básicos de patogenia são idênticos.
2. Embora muito comentado no passado, não há evidências da existência de portador-são.
3. Além de o vírus da raiva ser encontrado no sistema nervoso central (SNC) e em glândulas salivares de morcegos e carnívoros raivosos, outros tecidos podem conter abundante concentração viral.
4. Tanto a raiva paralítica como a furiosa têm sido descritas.
5. Há evidências de que os períodos de incubação mínimo e máximo semelhantes.

Diferenças

1. Há um maior número de variantes de *Lyssavirus* em morcegos do que em carnívoros, tanto no Velho Mundo como no Novo Mundo.
2. Não há uma forma bem-sucedida de controle da raiva em morcegos, como há a vacinação oral em canídeos silvestres.
3. A capacidade de vôo dá aos morcegos uma maior capacidade de dispersão do vírus da raiva.
4. O fenômeno de transmissão por aerossóis tem sido visto em condições de campo em morcegos.
5. Os morcegos foram a principal fonte de infecção da raiva na América do Norte e no Chile, até 2004. A partir de 2004-2005 foi, também, fonte de infecção na América Latina e em todo o mundo. As observações acima citadas são extremamente

importantes para o maior entendimento da raiva nas espécies silvestres, visando o seu controle.

Considerações finais

É de fundamental importância a implantação de programas de vigilância epidemiológica passiva, em nível nacional, visando determinar, regionalmente, as espécies de canídeos silvestres e morcegos importantes da epidemiologia da raiva, atuando como reservatórios, e a realização de estudos antigênicos e genéticos com os vírus isolados de espécies silvestres, verificando, assim, a especificidade de hospedeiros de determinadas variantes virais, mais frequentemente isoladas.

Em relação à raiva dos morcegos não-hematófagos, destaca-se que a destruição das colônias é absolutamente ineficaz. É necessário investir em linhas de pesquisa para conhecer a dinâmica da raiva nestas espécies, envolvendo equipes multidisciplinares.

Quanto aos canídeos, é preciso salientar que somente o monitoramento de espécies reservatórios e a análise de risco da raiva nelas poderão impedir que a raiva se torne uma reemergência em nosso País. A implantação de esquemas de vacinação oral para a população silvestre, baseados na engenharia genética, deve ser um tema discutido de forma integrada com profissionais da saúde, da agricultura e do meio ambiente.

Referências bibliográficas

1. Ito M, Arai TY, Itou T *et al.* Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. **Virology** 2001; 284, 214-222.
2. Favoretto SR, Carrieri ML, Cunha EMS *et al.* Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. **Rev Inst Med Trop S Paulo** 2002; 44: 91-5.
3. Warrell MJ & Warrell DA. Rabies and other lyssavirus diseases. **Lancet** 2004; 363(9413):959-69.
4. Rupprecht CE, Hanlon AC, Hemachudha T. Rabies re-examined. **Lancet Infect Dis.** 2002; 2: 327-343.
5. World Health Organization, Expert Consultation on Rabies. 1° Report. (Technical Report Series, 931). 2004. World Health Organization, Geneva.
6. Plotkin AS. Rabies. **Clin Infect Dis.** 2000; 30:4-12.

7. Tordo N, Bahloul C, Jacob Y *et al.* Rabies: Epidemiological tendencies and Control Tools. In: Doted b, Schudel A, Pastoret PP, Lombard M (eds). First International Conference on Rabies in Europe. Dev.Biol (Basel), Karger, 2006; 125: 3-13.
8. Belotto A, Leanes LF, Schneider MC *et al.* Overview of rabies in the Americas. **Virus Res.** 2005; 111(1): 5-12.
9. Simmons, NB. Order Chiroptera. In: Wilson DE, Reeder DM. (eds). Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference. 3.Ed. v.1. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005, p.312-529.
10. Peracchi AL, Lima IP, Reis NR *et al.* Orden Chiroptera. In: Reis, NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP (eds). Mamíferos do Brasil, 1. Ed. Londrina, Paraná, 2006, p.153-230.
11. Carini A. Sur une grande épizootie de rage. **Ann de L'Inst Pasteur** 1911; 25: 843-46.
12. Castilho JG, Travassos Rosa ES, Mantilla A *et al.* Human rabies transmitted by vampire bats: antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Ecuador and Brazil. In: Anais da XVII Reunión Internacional sobre avances en la investigación y control de la rabia en las Américas; 2006 oct. 15-20; Brasília (DF). Brasil 2006.p.73.
13. Travassos Rosa ES, Kotait I, Barbosa TFS *et al.* Bat-transmitted Human Rabies Outbreaks, Brazilian Amazon. **Emer Infect Dis.** 2006; 8: 1197-1202.
14. Kotait I. Controle da raiva dos herbívoros-Vacinação. **Past In Pasteur Informa** 2001; 6 p.3.
15. Wunner WH. Rabies in Americas. **Virus Res.** 2005; 111: 1-4.
16. Childs JE. Epidemiology. In: Jackson AC, Wunner W. **Rabies.** San Diego: Academic Press; 2002.p.113-62.
17. Favi M, De Mattos CA, Yung V *et al.* First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. **Emerg Infect Dis.** 2002; 8(1): 79-81.
18. Cisterna D, Bonaventura R, Caillou S *et al.* Antigenic and molecular characterization of rabies virus in Argentina. **Virus Res.** 2005; 109(2): 139-47.
19. Souza MCAM. Infecção experimental de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (E.Geoffroy) mantidos em cativeiro pela ingestão de sangue desfibrinado acrescentado de amostras de vírus da raiva. São Paulo; 2003 [Tese de doutorado Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP].
20. Scheffer KC. Pesquisa do vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. São Paulo; 2005 [Dissertação de Mestrado Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP].
21. Carrieri ML, Favoretto SR, Carnieli Jr *et al.* Canine and feline rabies in the Espírito Santo do Pinhal city, São Paulo, transmitted by vampire bat. In: **Virus: reviews and research/Sociedade Brasileira de Virologia**; 2001 nov 25-28; Caldas Novas. Vol 6 supl 1.p.176.
22. Kotait I, Favoretto SR, Carrieri ML *et al.* Raiva humana causada pela variante-3 *Desmodus rotundus* no Estado de São Paulo. In: Anais da XIII Reunión Internacional sobre avances en la investigación y control de la rabia en las Américas; 2002 nov 3-8; Cidade de Oaxaca (MX). Cidade de Oaxaca: 2002.p.35.
23. Badilla X, Herra VP, Quirós L *et al.* Human rabies: a reemerging disease in Costa Rica? **Emer Infect Dis.** 2003; 9(6): 721-723.
24. Carnieli PJr, Brandao PE, Carrieri ML *et al.* Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **Virus Res.** 2006; 120(1-2): 113-120.
25. Bernardi F, Nadin-Davis SA, Wandeler AI *et al.* Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. **J Gen Virol.** 2005; 86: 3153-62.
26. Sato G, Kobayashi Y, Shoji Y *et al.* Molecular epidemiology of rabies from Maranhao and surrounding states in the northeastern region of Brazil. **Arch Virol.** 2006; 151(11): 2243-51.
27. Favoretto SR, De Mattos CC, Morais NB *et al.* Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. **Emerg Infect Dis.** 2001; 7(6): 1062-1065.
28. Niezgodna M, Hanlon CA, Rupprecht CE. Animal rabies In: Jackson AC, Wunner W. **Rabies.** San Diego: Academic Press; 2002. p163-218.

Correspondência/Correspondence to:

Ivanete Kotait Instituto Pasteur
Av. Paulista, 393
CEP 01311-000 – São Paulo – Brasil
Tel. (55 - 11) 3288-0088
ikotait@pasteur.saude.sp.gov.br

Aspectos epidemiológicos da síndrome cardiopulmonar por hantavírus nas Américas

Epidemiological aspects of cardiopulmonar syndrome of hantavirus in the Américas

Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz – IAL
Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD
Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – SES-SP

Em junho de 1993, um novo hantavírus denominado *Sin Nombre* foi responsabilizado pela epidemia de doença respiratória grave na região Sudoeste dos Estados Unidos, representando o primeiro registro de síndrome cardiopulmonar por hantavírus (SCPH) no mundo³⁸. Sabe-se que esta epidemia foi desencadeada por um desequilíbrio da população do roedor hospedeiro “deer mouse” *Peromyscus maniculatus*⁷. Após um período prolongado de chuvas, causado pelo “El Niño”, a oferta de alimento nessa região desértica aumentou, levando a um incremento da população de roedores silvestres. Com o restabelecimento das condições climáticas, esta oferta diminuiu, levando os roedores a procurar alimentos nas residências rurais, ocasionando, desta forma, o contato do homem com os transmissores do vírus e, conseqüentemente, o aparecimento da doença⁴¹. O pico dos casos de SCPH ocorreu no final da primavera e no início do verão, e em proporções iguais entre homens e mulheres²³ – a doença clínica é rara em crianças.

Após a descoberta do vírus *Sin Nombre* como causador da síndrome cardiopulmonar por hantavírus (SCPH), foram identificados novos hantavírus associados às diversas espécies de roedores reservatórios da subfamília *Sigmodontinae*, exclusiva do Continente Americano. Atualmente, os estudos revelam que os hantavírus do Novo Mundo encontram-se distribuídos do Canadá até o Sul da Argentina⁴⁴.

A partir de 1994, com a ocorrência de casos esporádicos da doença, outros hantavírus foram detectados nos Estados Unidos, como o *Monongahela*, associado à espécie do roedor *Peromyscus maniculatus nubiterrae*, que ocorre nas montanhas Apalaches se estendendo da Geórgia ao Leste do Canadá^{34,55}; o vírus *New York*, associado ao “white footed mouse” *Peromyscus leucopus* (haplotipo oriental), no Nordeste dos EUA^{15,18}; o vírus *Blue River* foi encontrado infectando o roedor *Peromyscus leucopus* (haplotipos ocidentais) na parte central e ocidental dos EUA³⁷; o vírus *Black Creek Canal* associado ao “cotton rat” *Sigmodon hispidus* (tipo oriental), de ocorrência na Flórida⁴⁷; o vírus de

Muleshoe associado ao roedor *Sigmodon hispidus* (tipo ocidental)⁴⁸ e o vírus *Bayou*, descoberto em 1994, em um caso fatal de SCPH na Louisiana (EUA)³⁶. Subseqüentemente, o vírus foi detectado no “rice rat” *Oryzomys palustris*, estando presente em toda extensão da área de dominância desta espécie²⁶, associado a um caso não fatal de SCPH no Estado do Texas (EUA)^{17,25,23,49}.

No Brasil, em dezembro de 1993, no município de Jujuitiba (Estado de São Paulo), foi documentada, pela primeira vez, a ocorrência de casos humanos de SCPH causados por um hantavírus posteriormente denominado vírus *Jujuitiba*^{19,54,21}. O súbito aparecimento desse surto relaciona-se a dois fatores. O primeiro, à ocorrência do fenômeno natural conhecido como “ratada”, que se caracteriza pelo incremento da população de roedores após aumento da oferta de sementes produzidas durante a floração cíclica de várias espécies de bambus nativos da Mata Atlântica⁴². O segundo está relacionado com o desmatamento de uma área de mata nativa para a formação de uma chácara, coincidentemente no momento em que estava ocorrendo uma “ratada”. Tal procedimento provocou a invasão de roedores silvestres para o interior da casa feita de pau-a-pique, que abrigava uma família de posseiros⁴³.

A partir de 1994, foram notificadas centenas de casos de SCPH, supostamente associados ao vírus *Jujuitiba*, em regiões de Mata Atlântica de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A ocorrência de casos foi observada durante o ano, sendo que a maior incidência aconteceu durante a primavera e verão. A maioria dos acometidos desenvolvia atividades ocupacionais ligadas ao ramo da agricultura ou exploração florestal.

As habitações próximas de áreas das matas e agricultáveis foram o fator que mais contribuiu para a ocorrência dos casos. Posteriormente, os estudos de biologia molecular permitiram relacionar o vírus *Jujuitiba* a esses casos ocorridos em áreas da Mata Atlântica, associado ao *Oligoryzomys nigripes*, seu roedor reservatório^{21,56}, com ponto de distribuição nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (Figura 1).



Figura 1. Distribuição geográfica do roedor reservatório do vírus Juquitiba.

Também a partir de 1994, foram detectados casos em diversas regiões do Brasil e outros tipos de hantavírus foram identificados, tais como o *Castelo dos Sonhos*, associado a caso de SCPH, detectado na Mata Amazônica (município de Castelo dos Sonhos, Pará)²¹, cujo roedor hospedeiro ainda é desconhecido; e o vírus *Araraquara*, responsável pela ocorrência de centenas de casos de SCPH em regiões de Cerrado de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás e Brasília, posteriormente relacionado ao roedor *Bolomys lasiurus* como seu reservatório^{21,56}, cuja espécie e o vírus distribuem-se por todo o Cerrado (Figura 2).



Figura 2. Distribuição geográfica do roedor reservatório do vírus Araraquara.

A maior incidência dos casos de SCPH ocorreu no outono e inverno, provavelmente devido ao aumento da população de *Bolomys lasiurus* infectados, o que pode ser explicado pela restrição do ambiente durante os períodos secos, característicos dessas estações do ano. Observou-se que a maioria dos casos ocorreu, principalmente, em habitações humanas localizadas próximas de culturas de capim braquiária, seguido, em menor escala, pelas de milho, cana-de-açúcar, soja, arroz e plantio para reflorestamento^{43,22}.

Em 2000 foram identificados dois tipos específicos de hantavírus, associados a duas espécies de roedores reservatórios típicos da Mata Amazônica do Maranhão. O primeiro foi o vírus *Anajatuba*, no município de mesmo nome, situado numa área alagada conhecida como Baixada Maranhense, semelhante ao Pantanal mato-grossense, 100 quilômetros ao Sul da Capital São Luís³⁰. O vírus *Anajatuba* foi responsável pela ocorrência de sete casos de SCPH, dos quais cinco morreram. O seu roedor reservatório é o *Oligoryzomys fornesi*, pertencente ao mesmo gênero do roedor reservatório do vírus *Juquitiba*, na Mata Atlântica.

O segundo hantavírus encontrado no Maranhão foi o vírus *Rio Mearim*, nome do principal rio da região, que corta a área central do Estado. O vírus foi encontrado infectando roedores aquáticos da espécie *Holochilus sciureus*⁵⁰.

Em junho de 1993, pela primeira vez, foram notificados no Sul da Argentina casos de SCPH, causados por um vírus denominado *Andes*^{29,3}. O hospedeiro identificado foi o *Oligoryzomys longicaudatus*, que ocorre em grande número devido ao perfil agrícola de plantação de grãos em larga escala; deste modo, propiciou a epidemia que durou meses⁴. A Argentina apresenta, também, outras áreas de transmissão da SCPH por hantavírus distintos. Na região Noroeste o vírus *Oran*, que é transmitido pelo roedor *Oligoryzomys longicaudatus*, e o vírus *Bermejo*, pelo roedor *Oligoryzomys chacoensis*⁴⁵. Na região central do país os casos de SCPH estão relacionados com os vírus *Lechiguanas* e *Hu 39694*, ambos transmitidos pelo mesmo roedor *Oligoryzomys flavescens*²⁸. Tal ocorrência evidencia um fato raro: hantavírus diferentes hospedados por roedores da mesma espécie. Nessa região encontram-se, ainda, os vírus *Pergamino* e *Maciel*, mas infectando somente roedores das espécies *Akodon azarae* e *Necromys benefactus*, respectivamente²⁸.

A partir de setembro de 1995 foram detectados no Chile, pela primeira vez, casos de SCPH similares aos causados pelo vírus *Andes*, também associados ao roedor *Oligoryzomys longicaudatus*. A maioria dos casos foi registrada no Sul do país. Nessa região o fenômeno da "ratada" foi determinante para o início da epidemia⁵⁷. Até julho de 2003 haviam sido notificados mais de 300 casos, afetando pessoas do sexo masculino (72%) com atividades em meio agrícola e florestal (50%) e com idade média de 31,5 anos. Cerca de 16% dos casos se apresentaram em menores de 15 anos de idade.

No Paraguai, no início de 1995, pela primeira vez, foram notificados casos de SCPH. O vírus isolado do roedor *Calomys laucha* foi nomeado *Laguna Negra*, nome que deriva do fenômeno causado pela invasão

de residências rurais por ratos fugitivos de uma região de várzea inundada, durante um período de chuvas torrenciais, o qual gerou uma epidemia^{20,59}. Até 2002, haviam sido registrados mais de 90 casos de SCPH, com uma taxa de letalidade de 20%-30%. Cerca de 38% dos pacientes eram do sexo masculino e encontravam-se na faixa etária entre 12 e 70 anos, média de idade de 29 anos. A infecção por hantavírus foi bastante freqüente em população indígena, onde se detectou coeficiente de prevalência de até 40%.

No Uruguai, os casos de SCPH foram detectados em 1997, associados a ambiente agrícola, causados pelo vírus *Lechiguanas*, originalmente descrito na Argentina, tendo como reservatório o roedor *Oligoryzomys flavescens*⁹. Neste país, a SCPH comporta-se de uma forma diferenciada em relação aos países vizinhos, pois ocorre de forma esporádica e apresenta uma taxa de letalidade considerada baixa (21%) em relação aos demais vírus. Desde o primeiro diagnóstico em 1997 até 2002 menos de 40 casos haviam sido detectados.

A Bolívia tem registrado casos esporádicos desde 1997, supostamente causados pelo vírus *Rio Mamoré*, associado ao roedor *Oligoryzomys microtis*¹. O vírus também foi isolado na região Nordeste do Peru, em um único roedor, o *Oligoryzomys microtis*, o que evidencia também a circulação do vírus *Rio Mamoré* nesse país⁴⁶. Em 2002, a Venezuela registrou seus dois primeiros casos de SCPH associados ao vírus *Caño Delgado*³⁵. Este vírus já tinha sido isolado anteriormente no roedor *Sigmodon alstoni*¹².

A partir de 1994, especialmente no Sul do Canadá, foram detectadas dezenas de casos de SCPH associados ao vírus *Sin Nombre*, que tem como reservatório o roedor *Peromyscus maniculatus*^{58,10}. Entre os anos de 1999 e 2000, no Panamá foi confirmada a presença do vírus *Calabazo* no roedor *Zygodontomys brevicauda*, durante surto epidêmico dessa virose⁵. O vírus *Rio Segundo* foi isolado do roedor *Reithrodontomys mexicanus* na Costa Rica, mas apenas em 2002 foi observado caso humano associado a esse vírus nesse país^{15,51}.

Transmissão de hantavírus

Entre os roedores a transmissão ocorre, principalmente, por meio de mordidas e depois por aerossóis. Somente os roedores pertencentes às subfamílias *Murinae* e *Sigmodontinae* da família *Muridae* são hospedeiros naturais.

A distribuição viral pode acontecer em toda a área de ocorrência da espécie reservatória ou ser

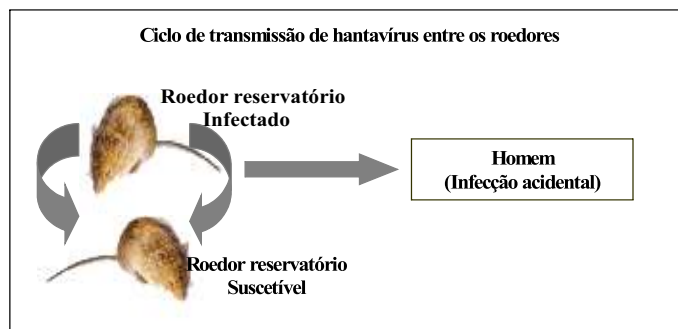


Figura 3. Ciclo de transmissão e manutenção de hantavírus na natureza.

restrita a uma pequena porção geográfica. Cada hantavírus está associado a uma única espécie de hospedeiro, assim, a distribuição de uma espécie de roedor restringe a ocorrência de seu hantavírus específico, dando apoio à teoria da co-evolução entre os vírus e seus reservatórios³³. Com exceção do vírus *Thottapalayan*, que tem como reservatório o animal insetívoro *Suncus murinus*, cada ramo da árvore filogenética dos hantavírus está associado a uma diferente subfamília de roedores. Deste modo, todos os hantavírus associados à SCPH, endêmicos no Continente Americano, têm como reservatórios roedores da subfamília *Sigmodontinae*; todos os hantavírus do Velho Mundo, responsáveis pela febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR), estão associados a roedores da subfamília *Murinae*, incluindo o vírus *Puumala*, relacionado a um roedor da subfamília *Arvicolinae*. Outros vírus não associados à doença humana, encontrados no hemisfério norte, estão associados à subfamília *Arvicolinae*⁵².

A infecção por hantavírus em seu roedor reservatório resulta em infecção crônica, aparentemente assintomática. Apesar da presença de anticorpos neutralizantes, o vírus persiste, sendo liberado na urina, fezes e saliva dos roedores. Porém, ainda são desconhecidos a duração e o período máximo de infectividade das partículas virais no meio ambiente^{27,21,44}. O vírus pode ser isolado, principalmente, a partir de fragmentos de pulmão, baço e rins colhidos dos roedores reservatórios.

A transmissão horizontal, via aerossol, entre roedores mantidos em laboratório foi documentada^{27,39}. Entretanto, no habitat natural dos roedores observa-se que a soroprevalência aumenta com o peso e, portanto, com a idade, destacando o papel predominante da transmissão horizontal na manutenção dos hantavírus na população dos reservatórios^{6,32}. A freqüência de cicatrizes devido às mordidas, nos encontros agressivos, também demonstra correlação com a soroprevalência de hantavírus em roedores, sugerindo a transmissão viral¹³. Filhotes de fêmeas infectadas demonstram circulação de anticor-

pos maternos, mas não existem evidências da transmissão vertical. Desta forma, a manutenção dos hantavírus no roedor reservatório é feita pelas infecções adquiridas durante encontros agressivos intra-específicos pós-idade juvenil⁴⁴.

A infecção humana ocorre, principalmente, por meio da inalação de partículas virais presentes em aerossóis, formados a partir de urina, fezes e saliva de roedores infectados³¹. A infectividade das partículas virais, que determina a resistência do vírus no meio ambiente, depende do meio em que os vírus estão inseridos. Os hantavírus se mantêm mais ativos quando eliminados em fezes e urina de roedores, aumentando ainda mais a infectividade quando são eliminados em locais fechados ou cobertos, livres da exposição aos raios ultravioletas do sol e efeitos dispersivos de corrente de ar. Outras formas mais raras de transmissão foram descritas, como ingestão de água e alimentos contaminados, por escoriações cutâneas ou mordeduras de roedores, contato do vírus com o tecido conjuntivo da boca, olhos e nariz.

No Brasil, a transmissão da SCPH ao homem está associada a fatores e fenômenos ambientais que forcem deslocamentos de populações de roedores. As inundações, queimadas e desmatamentos são os principais fatores que desalojam as colônias de roedores e as obrigam a procurar novos ambientes, aumentando o risco de exposição do homem pela invasão de roedores nas áreas residenciais. Outro fator importante na transmissão de hantavírus é o fenômeno da "ratada", caracterizado pela invasão das plantações e habitações humanas por superpopulações de roedores silvestres. Tal fenômeno deve-se à floração cíclica de espécies de taquaras nativas (a cada 12 ou 30 anos) que disponibilizam grande quantidade de sementes ao meio ambiente (como alimento), gerando o incremento populacional de roedores silvestres. Ao findar o período de floração esgota-se a oferta de alimento no ambiente, obrigando os roedores a buscarem outros locais para se alimentar.

Além de fatores naturais, as atividades agrícolas, construções inadequadas e o crescimento urbano, de forma desordenada, influenciam na dinâmica de transmissão de hantavírus.

As atividades agrícolas, domésticas ou de lazer, direta ou indiretamente associadas ao encontro com roedores ou suas excretas, constituem os principais fatores de risco para as infecções por hantavírus. As alterações na vegetação natural, em que o homem introduz plantas de interesse comercial, acabam fornecendo aos roedores existentes na natureza uma nova fonte de alimentação, propiciando o rápido aumento da densidade populacional de roedores

silvestres nas áreas ocupadas pelo homem. Entre as principais culturas que atuam dessa forma destacamos as de milho, soja, arroz, trigo, sorgo, aveia, capim braquiária, capim-colonião, cana-de-açúcar, batata-doce, mandioca, plantio de pinheiro (*Pinnus sp*) e de eucalipto (*Eucaliptus sp*).

A construção inadequada é o fator que mais tem contribuído para ocorrência de infecção por hantavírus. Está relacionado à construção de casas, silos, paióis, pocilgas, granjas, cocheiras, galpões, garagens e demais anexos domiciliares, inseridos no ambiente silvestre ou agrícola sem obedecer a uma distância mínima de 50 metros. Desta forma, as construções humanas permitem a entrada esporádica de roedores, atraídos por alimentos armazenados ou acidentalmente. A operação de limpeza de locais abandonados, silos e depósitos, que freqüentemente são visitados por roedores, pode ser também uma fonte de transmissão do vírus.

O crescimento urbano, devido à expansão natural das cidades, tem trazido consigo a construção de moradias, conforme as cidades avançam e penetram em regiões rurais, agrícolas e silvestres que circundam os municípios, sendo a transmissão, erroneamente, classificada como transmissão urbana e não periurbana. Observa-se que hoje, no Brasil, existem muitos municípios em fase de crescimento natural da área urbana, levando ao surgimento de pequenas vilas periféricas, pelo loteamento de antigas fazendas. Normalmente, as novas residências das vilas são construídas em locais de plantio abandonados ou em trechos da vegetação silvestre que ainda mantêm populações de roedores silvestres, permitindo um ocasional contato com o homem e expondo-o, assim, à infecção por hantavírus.

Manifestações clínicas

A SCPH apresenta período de incubação de, em média, 14 dias, variando de 4 a 42 dias; em sua forma clássica, evolui em quatro fases distintas: febril ou prodrômica, cardiopulmonar, diurética e convalescença.

A fase prodrômica é caracterizada por febre, tosse seca, mialgia, principalmente na região dorso lombar, dor abdominal e diarreia, náusea, vômito, astenia e cefaléia intensa. Esta fase dura em média de 3 a 5 dias, podendo evoluir para a fase cardiopulmonar.

Na fase cardiopulmonar observa-se, inicialmente, tosse e dificuldade respiratória, seguida de sinais físicos como taquipnéia, taquicardia, hipotensão e edema pulmonar. A hipotensão e o edema pulmonar se manifestam rapidamente entre 4 e 24 horas. A

maioria das mortes ocorre durante esta fase. O início do edema se manifesta nas radiografias do tórax com presença de infiltrado intersticial nos campos pulmonares, com ou sem derramamento pleural, que, quando presente, pode ser uni ou bilateral^{40,2}.

As alterações laboratoriais geralmente observadas no 4º ou 5º dia de doença são: a hipóxia (PO₂ < 70mmHg), a creatininemia elevada (> 1,5mg/100ml), a hemoconcentração (hematócrito aumentado > 45%), a trombocitopenia (plaquetas < 150.000 cel/mm³), a leucocitose (leucócitos > 12.000 cel/mm³), com neutrofilia acentuada e desvio à esquerda e linfopenia relativa com presença de linfócitos atípicos^{2,11}.

A fase diurética inicia-se com a diurese espontânea, pela eliminação rápida de líquido acumulado do edema pulmonar e a resolução da febre e do choque. A fase de convalescença é lenta, podendo durar duas semanas ou mais, com recuperação supostamente completa das alterações hemodinâmicas e a da função respiratória dos pacientes sobreviventes^{40,11,2}.

Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial de hantavirose pode ser direto e indireto, a partir de sangue ou material de necropsia, de humanos e de roedores. Os testes sorológicos, usualmente empregados para a detecção de anticorpos específicos, são os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), a imunofluorescência indireta em células VERO E-6 infectadas e a neutralização por redução de placa (PRNT)⁴⁴. Atualmente, o teste de preferência para a detecção de anticorpos específicos é o ELISA com captura de anticorpos IgM²⁵, que apresenta grande sensibilidade. Cerca de 95% dos pacientes com SCPH já apresentam níveis detectáveis de anticorpos IgM ainda na fase aguda da doença, possibilitando um diagnóstico rápido⁴⁰. O ELISA para detecção de anticorpos IgG pode ser empregado no diagnóstico (utilizando-se duas amostras para verificação de conversão sorológica), em estudos visando determinar a prevalência de indivíduos com cicatriz imunológica para hantavírus e na sorologia de roedores²².

A técnica de reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) tem se mostrado eficiente na detecção de RNA viral em amostras de soro e de coágulo sanguíneo, colhidas o mais precocemente possível, até o sétimo dia da doença. O seqüenciamento de produto amplificado por RT-PCR possibilita a caracterização genética dos hantavírus^{38,14,60,44}. Os casos de SCPH descritos nas Américas têm apresentado anticorpos que também reagem com o antígeno do vírus *Sin Nombre*, no teste de ELISA, tanto na captura de IgM como IgG. A

presença de anticorpos específicos da classe IgM ou a soro conversão para anticorpos IgG, reações positivas por PCR ou imunohistoquímica, associados à clínica e à epidemiologia, permitem estabelecer o diagnóstico para hantavírus.

A reação de imunohistoquímica utilizando anticorpos monoclonais e policlonais tem sido muito útil na confirmação da presença do antígeno viral em tecidos e fragmentos de órgãos. Emprega-se o exame imunohistoquímico para busca do antígeno (Ag) específico. Este pode ser encontrado principalmente em fragmentos de pulmão, coração, baço, fígado e linfonodos. Os materiais devem ser colhidos até 24 horas após o óbito e conservados em formalina tamponada ou blocos parafinados^{60,61}.

O isolamento viral pode ser feito a partir de fragmentos de pulmão, baço e rins colhidos dos roedores e humanos, pela inoculação deste material em culturas de células (VERO E-6, A 549 e pulmão de rato). A infecção não produz efeito citopático, mas pode ser detectada por imunofluorescência indireta. Por se tratar de um agente de alto risco e transmitido por aerossóis, para realizar o seu isolamento é necessário à existência de laboratório com nível de segurança três (quando o isolamento for feito em cultura celular) ou quatro (quando for utilizado modelo animal)⁴⁴.

Vigilância epidemiológica

A vigilância epidemiológica é uma atividade contínua e sistemática de coleta, análise e interpretação de dados com a finalidade de monitorar eventos na saúde das populações de suas respectivas áreas de atuação. Ao se disseminar de forma constante e regular esses resultados permite-se a proposição e a avaliação de medidas de prevenção e controle desses mesmos eventos, bem como apoiar a definição de necessidades e o estabelecimento de prioridades para um sistema de saúde.

A vigilância epidemiológica da hantavirose tem como objetivo:

- detectar precocemente casos e/ou surtos;
- conhecer a história natural da hantavirose no Brasil;
- identificar fatores de risco associados à doença;
- identificar as variantes de hantavírus circulantes no Brasil;
- conhecer a distribuição geográfica dos hantavírus no Brasil;
- recomendar e executar medidas de prevenção e de controle e
- estudar a tendência da doença.

Definições de caso suspeito

- Paciente com doença febril, geralmente acima de 38°C, mialgias, acompanhadas de um ou mais dos seguintes sinais e sintomas: calafrio, astenia, dor abdominal, náusea, vômito e cefaléia intensa, insuficiência respiratória aguda de etiologia não determinada ou edema pulmonar não cardiogênico, na primeira semana da doença, ou
- paciente com enfermidade aguda, apresentando quadro de edema pulmonar não cardiogênico, com evolução para o óbito, ou
- paciente com história de doença febril e com exposição à mesma fonte de infecção de um ou mais casos de hantavirose confirmados laboratorialmente.

Definições de caso confirmado

a) Critério laboratorial

- Sorologia reagente para anticorpos séricos específicos para hantavírus da classe IgM, ou
- soroconversão para anticorpos séricos específicos da classe IgG (aumento de quatro vezes ou mais no título de IgG, entre a primeira e segunda amostra), ou
- imunohistoquímica de tecidos positiva (identificação de antígenos específicos contra hantavírus), ou
- RT-PCR positivo.

b) Critério clínico epidemiológico

Indivíduo com quadro clínico compatível e que tenha freqüentado áreas conhecidas de transmissão de hantavírus ou exposição à mesma situação de risco de pacientes confirmados laboratorialmente, apresentando, obrigatoriamente, as seguintes alterações:

- raios-X de tórax com infiltrado intersticial bilateral nos campos pulmonares, com ou sem a presença de derrame pleural, que pode, quando presente, ser uni ou bilateral;
- hemoconcentração (hematócrito > 45%) e
- trombocitopenia (plaquetas < 130.000 plaquetas/mm³).

Investigação epidemiológica

Iniciar o mais precocemente a investigação do caso suspeito, com vistas a se determinar, dentre outros, o local provável de infecção (LPI) e os fatores determinantes para a ocorrência da doença, como as atividades e situações de risco de exposição do paciente nos últimos 60 dias anteriores ao início dos sintomas.

Roteiro para investigação epidemiológica

A hantavirose é uma doença emergente e ainda desconhecida para muitos profissionais da rede de serviços de saúde. Dado o seu grande potencial de infecção, é imprescindível a adoção de medidas de segurança por parte dos profissionais responsáveis pela investigação, principalmente no que se refere à identificação dos locais prováveis de infecção.

a) Coleta de dados gerais e de antecedentes epidemiológicos

Preencher todos os campos da Ficha de Investigação Epidemiológica do Sistema Nacional de Informações de Doenças de Notificação (Sinan) relativos aos dados gerais, do caso e de residência, além dos referentes às atividades ou situações de risco nos últimos 60 dias anteriores ao início da doença.

Na impossibilidade do paciente fornecer os dados, buscar as informações junto aos familiares, vizinhos, colegas de trabalho e/ou de lazer. Investigar atividade ocupacional, lazer, viagens, acampamentos e outras, neste período.

b) Coleta de dados clínicos, de tratamento e laboratoriais

Como, em geral, quando se notifica a suspeita de SCPH os doentes já estão hospitalizados, as informações devem ser levantadas no prontuário e os profissionais da área médica e de enfermagem entrevistados, para completar as informações clínicas e sobre os achados laboratoriais e de raios-X do paciente.

Sugere-se que seja feita uma cópia da anamnese, exame físico e da evolução do doente, com vistas ao enriquecimento das análises e, também, para que possam servir como instrumento de aprendizagem dos profissionais do nível local.

Anotar informações sobre se o paciente buscou atendimento anteriormente em outro serviço ou no mesmo hospital, porém em outra data. Essa informação é importante para auxiliar na definição da data de início dos sinais/sintomas, bem como avaliar a sensibilidade do sistema de vigilância/assistência em detectar precocemente os casos.

Verificar se as amostras para exames laboratoriais foram coletadas de acordo com as normas e procedimentos indicados. Acompanhar a evolução dos pacientes e os resultados dos exames laboratoriais específicos.

c) Busca ativa de contatos

Define-se como contato de caso de hantavirose toda pessoa que esteve exposta à mesma situação ou exposição de risco do caso investigado. Assim,

devemos considerar as pessoas que tenham residido ou residam ou tenham exercido ou exerçam atividades ocupacionais ou de lazer, rotineiras ou esporádicas, no mesmo ambiente que tenha sido definido como de risco para a transmissão do vírus, considerando-se o período 60 dias de incubação.

Realizar busca ativa de contatos do paciente junto à residência e nos locais de trabalho ou de lazer, incluindo na pesquisa todos os indivíduos com processo infeccioso inespecífico e com sintomas respiratórios, nos últimos 60 dias ao aparecimento dos sintomas do caso sob investigação.

Para cada novo caso suspeito encontrado, coletar material para sorologia da pesquisa de IgM e preencher uma nova Ficha de Investigação Epidemiológica.

d) Identificação do LPI

Define-se por local provável de infecção (LPI) aqueles que tenha(m) sido freqüentado(s) pelo caso suspeito ou confirmado, nas últimas oito semanas (60 dias) antes do início dos primeiros sintomas. Esses locais devem apresentar condições favoráveis à presença de roedores silvestres (água, abrigo e alimento), aliadas a fatores como:

- desmatamento, corte de árvores, corte de lenha;
- aragem, plantio ou colheita em campo;
- transporte, armazenagem e moagem de grãos;
- arrumação ou manuseio de fardos de capim, lenha ou outros semelhantes;
- limpeza de celeiros ou outras construções (tulhas, paióis e silos);
- adentrar, dormir e/ou limpar residências ou qualquer habitação, desabitadas ou não ocupadas, por qualquer período;
- presença de capim, principalmente *Brachiaria decumbens*;
- roças abandonadas, faixas de capim não ocupadas;
- mudanças temporárias no perfil agrícola que alterem a disponibilidade de alimentos (grãos) ou outros fenômenos naturais periódicos que aumentem a disponibilidade de alimentos para os roedores silvestres, como a floração das taquaras;
- fatores ambientais que provoquem o deslocamento de roedores para as residências ou arredores de habitações humanas, como desmatamento, queimadas, enchentes, alagamentos, entre outros;
- alterações climáticas com reflexos diretos na população de roedores ou na disponibilidade de alimento;

- exposição em ambiente rural e/ou silvestre em atividades profissionais ou de lazer (caça, pesca, ecoturismo) e
- contato direto e/ou visualização de rato vivo ou morto ou suas excretas/vestigios (fezes, urina e/ou cheiro da urina).

Recomenda-se aos profissionais de saúde que usem máscaras de pressão negativa com filtro P3 sempre que a investigação epidemiológica exigir que freqüentem locais com suspeita de contaminação, sejam ambientes fechados, com sinais de infestação de roedores e suas excretas.

e) Encerramento da investigação epidemiológica

De acordo com as informações levantadas e produzidas, o investigador deve definir o LPI, bem como os fatores determinantes para a transmissão da infecção e a conclusão sobre o caso suspeito, com a confirmação ou o descarte dele.

f) Investigação ecoepidemiológica

Com a definição do LPI de qualquer caso humano há necessidade de se conhecer a fonte de infecção, ou seja, o roedor reservatório. Em áreas onde ele não é conhecido, devem ser realizadas atividades de investigação ecológica, com vistas à identificação da espécie de roedor que atua como reservatório do hantavírus.

A vigilância ambiental tem por objetivos: identificar as espécies prevalentes de roedores silvestres; determinar as espécies de roedores que podem ser os reservatórios e identificar novas variantes virais, bem como as respectivas distribuições geográficas.

Devem ser executadas ações de vigilância ecológica, pois a captura e manipulação de roedores silvestres e a coleta de amostras são atividades consideradas de alto risco, que necessitam do uso de equipamentos de proteção individual em NS-3. Além disso, requer técnicos capacitados para esse tipo de atividade.

Vigilância ecoepidemiológica

A vigilância ecoepidemiológica é realizada no local provável de infecção com o intuito principal de identificar as variantes de hantavírus circulantes e seus respectivos roedores reservatórios. Também objetiva estudar a fauna, o comportamento e a dinâmica populacional dos roedores no ambiente do LPI. Estes estudos visam ao diagnóstico aprofundado da situação epidemiológica humana e animal, favorecendo o conhecimento sobre a história natural da doença, o planejamento e o direcionamento das ações de intervenção.

Nas Américas, as espécies de roedores silvestres envolvidas diretamente na condição de reservatórias dos vírus causadores da SCPH pertencem à subfamília *Sigmodontinae* da família *Muridae*.

Para a identificação da espécie reservatória é necessário realizar capturas de roedores no local provável de infecção e ambientes próximos, os quais foram considerados relevantes para os estudos que estão sendo efetuados. Estes roedores podem ser encontrados nas áreas e ambientes externos, mas deve-se considerar a possibilidade de invadirem, mesmo que esporadicamente, as residências e anexos peridomiciliares.

Medidas de segurança

Os hantavírus são altamente patogênicos ao homem, e, sendo transmissíveis por aerossóis de partículas virais formados a partir de excretas de roedores contaminados, é obrigatório medidas de segurança nível três NS-3 durante trabalhos que envolvam roedores silvestres. Isto inclui o uso de aventais descartáveis, botas de borracha, luvas cirúrgicas, luvas de borracha, óculos protetores e máscara semifacial com filtro P3 (de pressão negativa) ou, preferencialmente, aparelhos para filtragem de ar com filtros HEPA, associados à máscara de pressão positiva (Figura 4).



Figura 4. Normas de segurança nível três (NS-3) empregadas em trabalhos de campo.

Sendo assim, é importante que os técnicos envolvidos nos trabalhos de capturas e coletas de amostras de roedores silvestres tenham consciência de que estarão expostos aos agentes infecciosos e aos animais potencialmente transmissores. Deve ser

bem esclarecido que para reduzir ao mínimo os riscos de infecção estes profissionais devem seguir disciplinarmente as condutas e procedimentos gerais específicos de segurança biológica.

Medidas de prevenção e controle

Medidas de prevenção em relação aos reservatórios (roedores silvestres)

A anti-ratização ou controle mecânico envolve medidas sistemáticas de saneamento e alterações nos ambientes e residências, que venham a impedir o contato direto ou indireto com os roedores ou suas excretas e secreções. Estas providências básicas são essenciais ao controle populacional de roedores, constituindo-se na forma ideal para evitar sua instalação e proliferação. Assim, destacam-se, entre elas, as seguintes:

- eliminar os resíduos que possam servir para abrigos, construção de tocas e ninhos, assim como reduzir as fontes de água e alimento para o roedor;
- evitar entulhos e objetos inúteis no interior e ao redor do domicílio pela limpeza diária;
- cortar a grama e arbustos ao redor da casa, num raio de pelo menos 50 metros;
- conservar os produtos e os alimentos armazenados no interior dos domicílios em recipientes bem fechados e a 40 cm do solo;
- vedar fendas e outras aberturas com diâmetro superior a 0,5 cm para impedir o ingresso de roedores no interior dos domicílios e anexos;
- não deixar rações de animais expostas e remover diariamente as sobras dos alimentos de animais domésticos, dando-lhes um destino adequado;
- lavar pratos e utensílios de cozinha imediatamente após o seu uso, removendo todos os restos de comida e dando a estes um destino adequado;
- enterrar o lixo orgânico e o inorgânico das áreas urbana e rural separadamente, caso não exista coleta regular, respeitando-se uma distância mínima de 30 metros do domicílio;
- respeitar, no plantio, uma distância mínima de 50 metros do domicílio, delimitando as áreas silvestres;
- não pernoitar no campo os produtos colhidos, assim como os restos de colheita;
- armazenar insumos agrícolas, equipamentos e outros objetos em galpões distantes pelo menos 30 metros dos domicílios, sobre estrados de, no mínimo, 40 cm de altura;

- armazenar produtos agrícolas (grãos e hortifrutigranjeiros) sobre estrados com 40 cm de altura do piso, em depósitos (silos e tulhas) situados a uma distância mínima de 50 metros do domicílio ou de áreas de plantio, pastagem e matas nativas e
- suspender o silo ou tulha a uma altura de 40 cm do solo, com escada removível e "rateiras" dispostas em cada suporte.

O armazenamento em estabelecimentos comerciais deve seguir as mesmas orientações do armazenamento em domicílio e em silos de maior porte.

Um dos fatores determinantes associado às infecções humanas por hantavírus é a inadequação de certos procedimentos nas colheitas agrícolas, uma vez que algumas culturas de alimentos constituem-se em ambientes apropriados para a instalação de colônias de roedores silvestres.

Tem-se verificado práticas de risco nas colheitas mecanizadas ou manuais, como, por exemplo, de sementes e grãos de capim braquiária, de milho, de amendoim e de outras culturas. Nesses casos, podem ser idealizadas novas metodologias de manejo, tais como a técnica de rotação de culturas, a aragem de toda a área de plantio após cada ciclo e soterramento dos restos das lavouras anteriores. Deve-se fazer uso de equipamentos de proteção individual durante a atividade.

Orientações de prevenção em relação aos profissionais de vigilância em saúde

Quando da investigação de um caso de hantavirose, principalmente ao se buscar a determinação do LPI, profissionais das áreas de vigilância epidemiológica, sanitária ou ambiental poderão ser expostos à infecção por hantavírus.

As habitações e outros prédios que tenham permanecido fechados devem ser ventilados por, pelo menos, meia hora antes que as pessoas adentrem nelas. Os técnicos que ingressarem em ambientes passíveis de contaminação com excretas de roedores devem fazê-lo com proteção respiratória, usando máscaras ou respiradores com filtros de alta eficiência P3 e luvas de borracha.

Orientações de prevenção em relação à população em geral

Informar aos moradores da região sobre a doença, quais são os roedores envolvidos, as vias de transmissão, os sinais e os sintomas. Orientá-los sobre as medidas de prevenção e controle da hantavirose e a importância de procederem às ações anti-reservatórios para manter a área livre da presença desses animais, tais como: roçar o terreno em volta da casa, dar destino adequado aos entu-

lhos existentes, manter alimentos estocados em recipientes fechados e à prova de roedores, além de outras medidas de efeito imediato, necessárias à situação específica.

Medidas de controle (intervenção)

A intervenção ou controle se faz sobre o agente e a fonte de infecção (reservatório), sob a égide do manejo ambiental. Este controle das fontes de infecção (roedores silvestres) é dado pelas práticas corretivas do meio ambiente, principalmente por meio do saneamento básico e da melhoria das condições de moradia.

Estas podem ser seguidas ou associadas às desratizações domiciliares e/ou peridomiciliares, quando em área de ocorrência da doença. A desratização, neste caso, visa interromper a cadeia de transmissão da doença, com a supressão do possível reservatório envolvido naquele domicílio.

Medidas em relação ao vírus

Estas implicam a adoção de providências a fim de atingir diretamente o agente da doença. Os hantavírus possuem um envelope de dupla camada lipoprotéica que é sensível a muitos detergentes e desinfetantes. Os vírus são inativados ao serem submetidos a produtos químicos com pH muito ácido ou alcalino, bem como a elevadas concentrações salinas. Entre estes produtos incluem-se as soluções de hipoclorito de sódio 2,5% a 10%, álcool etílico a 70%, a 10% e compostos fenólicos como o Lysol (o-phenylphenol a 2,8%; o-benzyl-p-clorophenol a 2,7%). Os hantavírus são, também, sensíveis à luz ultravioleta, sendo facilmente inativados quando exposto aos raios solares no meio ambiente^{38,21,53}.

A descontaminação de residências, paióis, galpões e outros anexos peridomiciliares onde possa haver roedores e/ou suas excretas será necessária, seguindo as normas de segurança NS-3. Esta medida deve ser adotada juntamente com a limpeza de áreas com evidência de atividade dos reservatórios (roedores mortos, vestígios, excretas e secreções), visando à redução da exposição a risco de contaminação com materiais contaminados por hantavírus.

Medidas em relação aos reservatórios (roedores silvestres)

A prevenção da infecção pelos reservatórios é dada pelas práticas corretivas do meio ambiente, principalmente por meio do saneamento, da melhoria das condições de moradia, tornando as habitações e os campos de trabalhos impróprios à instalação e proliferação de roedores (medidas de anti-ratização).

No entanto, caso as mesmas não tenham sido adequadas ou suficientes, podem ser seguidas ou associadas às medidas de controle, como as desratizações focais, quando em área de ocorrência da doença. A desratização, neste caso, visa interromper a cadeia de transmissão da doença, com a supressão do possível reservatório envolvido naquele LPI. Pode-se, ainda, realizar o controle biológico envolvendo predadores naturais, a partir da cadeia alimentar conhecida no próprio ambiente.

Desratização

Uma área é considerada infestada por roedores quando é possível a observação direta desses animais ou por dedução, com a observação de ninhos, presença de fezes, cheiro de urina ou alimentos roídos. Perante qualquer uma dessas evidências, devem ser adotadas medidas imediatas.

A desratização consiste na aplicação de raticidas, por pessoal técnico especializado, visando eliminar os roedores presentes da área tratada. Nos ambientes silvestres não é recomendada rotineiramente, podendo ser utilizada em áreas limitadas onde ocorreram casos humanos de hantavirose ou onde haja alta infestação de roedores reservatórios representando risco à saúde pública, após rigorosa avaliação técnica.

No ambiente residencial e peridoméstico o uso de raticidas é indicado no controle de roedores muríneos e na formação de barreira química permanente contra a invasão de roedores sigmodontíneos silvestres, os quais normalmente não freqüentam o ambiente doméstico.

A desratização deverá ser realizada, permanentemente, no interior de residências e construções anexas, a fim de se formar uma barreira química visando controlar a população de roedores presentes e impedir a invasão dos roedores silvestres nos locais em questão. O controle químico deve ser feito tendo em vista as medidas mecânicas apropriadas para as situações, tais como:

- Após a eliminação de objetos inúteis e entulhos associados ao acondicionamento adequado de alimentos e remoção de quaisquer outras fontes de alimento para o roedor, deve-se aplicar o raticida adequado para cada situação, levando-se também em conta a espécie de roedor infestante.
- Na época de colheita agrícola (principalmente de alimentos atrativos aos roedores, como milho, arroz, sorgo, trigo e braquiária), após seu ensacamento e acondicionamento em estrados no interior de tulhas, silos ou outros tipos de depósitos devidamente ventilados, deve-se reforçar o controle químico em anexos peridomiciliares, a fim

de conter o contingente extra de roedores atraídos pelo alimento estocado.

- Durante a ocorrência de queimadas, tanto em área silvestre como agrícola, ocorre a mortalidade de roedores; os sobreviventes, com a perda de seu habitat natural, acabam invadindo as residências e área peridoméstica à procura de alimentos. Neste caso, é conveniente a intensificação de barreira química em locais estratégicos domiciliares e peridomiciliares.
- Em áreas onde ocorreram desmatamentos recentes, a perda do habitat natural de algumas espécies de roedores provoca seu deslocamento para o interior de residências e anexos, sendo também necessário intensificar a aplicação de raticidas.
- Em períodos de enchente os roedores são obrigados a deslocar-se das áreas alagadas para os pontos mais altos do terreno, onde, comumente, situam-se as residências. Desta forma, é comum esses roedores invadirem o interior de residências e anexos peridomiciliares, e outra vez indica-se o reforço da desratização.

Até o momento não existe legislação específica no Brasil normalizando o emprego de raticidas em área agropecuária, pois a legislação existente normaliza a utilização de raticidas apenas para uso domissanitário (conforme Portaria nº10/SNVS, de 8 de março de 1985/Ministério da Saúde). Todavia, em regiões onde a infestação de roedores provocou a ocorrência de casos humanos da doença, e após rigorosa avaliação técnica, constatou-se circulação do vírus; e onde a presença do roedor representa um risco de agravo à saúde pública recomenda-se o uso temporário de raticidas em áreas limitadas, nas seguintes situações:

- Quando plantações infestadas de roedores encontrarem-se a menos de 50 metros de residências e anexos peridomiciliares. Nesta situação, devem ser aplicados, temporariamente, nas áreas limítrofes das plantações, raticidas adequados, formando-se uma barreira química. Neste caso, após a colheita, a fim de solucionar o problema de forma definitiva, a próxima lavoura deverá ser alocada em uma nova área, respeitando-se o mínimo de 50 metros de distância das áreas domiciliares e anexos peridomiciliares.
- Quando ocorrer infestação de roedores em leiras (sulcos em terras aradas), curvas de níveis e valas de irrigação. Assim, aconselha-se o uso temporário de raticidas a fim de se obter o controle de roedores. Cabe enfatizar que, nestes casos, o ideal é o controle mecânico, como manter as leiras, curvas de nível e valas de irrigação roçadas ou, em último caso, queimá-las ou soterrá-las.

Cabe ainda mencionar que de forma alguma podem ser utilizados raticidas em áreas silvestres, como matas nativas, incluindo as residuais e ciliares, e cerrados, dentre outras. Esta medida é importante para a manutenção de predadores naturais dos roedores, uma vez que funcionam como barreira natural ao deslocamento dos mesmos para áreas residenciais e agrícolas.

No entanto, é importante salientar que o uso de raticidas em roedores silvestres não é recomendado rotineiramente quando não houver casos humanos de SCPH, uma vez que essas espécies são importantes elos de muitas cadeias ecológicas e sua supressão indiscriminada acarretaria desequilíbrios significativos na biocenose.

Após a eliminação dos roedores, se não forem adotadas as medidas preventivas (anti-ratização), eles serão imediatamente substituídos por outros do meio silvestre.

Controle biológico

O controle biológico pressupõe o uso de um ser vivo para controlar outro ser vivo. No caso dos roedores silvestres, seu controle biológico será exercido por animais que são seus predadores naturais, como as serpentes, as aves de rapina (corujas e gaviões, por exemplo), as raposas e gatos-do-mato, dentre outros. Portanto, qualquer medida que auxilie a livre instalação e a proliferação desses predadores naturais dos roedores é recomendada, como por exemplo:

- reprimir a caça ou a destruição intencional desses predadores;
- manter as matas residuais e ciliares e
- reflorestar áreas desmatadas, empregando espécies nativas.

Medidas em relação aos ambientes contaminados

Considerando-se que os roedores contaminam o ambiente com suas excretas, devem ser tomadas precauções quanto à limpeza de ambientes contaminados. A limpeza e a desinfecção dos locais onde tenham sido diagnosticados casos de hantavirose deverão ser orientadas por técnicos treinados para tal atividade; os que as executarem deverão estar sempre devidamente equipados com EPIs adequados.

Medidas de prevenção deverão ser consideradas quanto às habitações que tenham permanecido fechadas, a ser ventiladas por, pelo menos, 30 minutos antes do ingresso de pessoas no local.

As pessoas que ingressem em locais fechados, potencialmente contaminados com excretas de roedores, devem fazê-lo com proteção respiratória de

máscara ou respiradores com filtros P3. Nestas habitações deve-se realizar a limpeza umedecendo piso e paredes com os desinfetantes recomendados como Lysol a 10% ou hipoclorito de sódio (2,5%) ou lisofórmio a 10%, o que evitará a formação de aerossóis. Não varrer ou aspirar tapetes, carpetes ou pisos secos sem antes umedecê-los com um desinfetante.

Os móveis e utensílios no interior devem ser limpos com pano embebido em Lysol a 10% ou outros desinfetantes, conforme as diluições apresentadas nos Quadros 1, 2 e 3.

Quadro 1. Preparo de solução de desinfetante a 10% a base de Lysol* puro.

Volume de água	Lysol puro*		Tempo de contato
	Dosagem	Medida prática	
9 litros	1 litro	1 litro	10 minutos
900 ml	100 ml	2 copinhos de café	10 minutos

**Ingredientes: o-phenylphenol (2,8%); o-benzyl-p-clorophenol (2,7%). Este produto é o mais indicado para descontaminação de armadilhas, roupas, móveis e ambientes no geral, por ter largo espectro viricida e não apresentar propriedades corrosivas ou tóxicas.*

Quadro 2. Preparo de solução de desinfetante a 10% a base de hipoclorito de sódio a 2,5%.

Volume de água	Hipoclorito de sódio a 2,5%*		Tempo de contato
	Dosagem	Medida prática	
9 Litros	1 litro	1 litro	60 minutos
900 ml	100 ml	2 copinhos de café	60 minutos

(* *Este produto, nesta diluição, encontra-se no mercado com os nomes de água sanitária, água de lavadeira e outros.*

Quadro3. Preparo de solução de desinfetante a 10% a base de Lisofórmio bruto.

Volume de água	Lisofórmio bruto		Tempo de contato
	Dosagem	Medida prática	
9 litros	1 litro	1 litro	60 minutos
900 ml	100 ml	2 copinhos de café	60 minutos

A Secretaria Municipal de Saúde deverá ser consultada sobre recomendações do tipo e concentração de outros produtos a serem utilizados.

As pessoas envolvidas na limpeza devem utilizar luvas de borracha. Ao terminar o trabalho, deve-se lavá-las antes de retirá-las das mãos em uma solução de Lysol a 10% ou hipoclorito de sódio (2,5%) a 10% ou lisofórmio a 10% e, após a sua retirada, lavar as mãos com abundante água e sabão.

Roupas potencialmente contaminadas deverão ser pulverizadas com qualquer uma das soluções desinfetantes indicadas, encharcando-as e deixando o produto agir por 30 minutos. Posteriormente, devem ser lavadas em água e sabão ou detergente e secadas ao sol. Estas recomendações também são indicadas para limpeza de equipamentos e outros materiais que tenham permanecido no campo e possam ter sido contaminados por roedores.

Referências bibliográficas

1. Bharadwaj M, Botten J, Torrez-Martinez N, Hjelle B. Rio Mamore virus: genetic characterization of a newly recognized hantavirus of the pygmy rice rat, *Oligoryzomys microtis*, from Bolivia. **Am J Trop Med Hyg** 1997; 57(3):368-74.
2. Funasa. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília (DF); 2002;385-403.
3. Cantoni G, Lázaro M, Resa A, Arellano O, Amestoy AM, DeBunder S, Herrero E, Perez A, Larrieu E. Hantavírus pulmonary syndrome in the province of Rio Negro, Argentina, 1993-1996. **Rev Inst de Med Trop** 1997; 39: 191-196.
4. Cantoni G, Padula P, Calderon G, Mills J, Herrero E, Sandoval P, Martinez V, Pini N, Larrieu E. Seasonal variation in prevalence of antibody to hantavirus in rodents from southern Argentina. **Trop Med Int Health** 2001; 6:811-816.
5. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Hantavirus pulmonary syndrome. Panama 1999 – 2000. **MMWR** 2000; 49(10): 205-207.
6. Childs JE, Glass GE, Korch GW, LeDuc JW. Prospective seroepidemiology of hantaviruses and population dynamics of small mammal communities of Baltimore, Maryland. **Am J Trop Med Hyg** 1987; 37(3):648-62.
7. Childs JE, Ksiazek TG, Spiropoulou CF, Krebs JW, Morzunov S, Maupin GO, Gage KL, Rollin PE, Sarisky J, Enscoe RE, Frey JK, Peters CJ, Nichol ST. Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as the primary rodent reservoir for a new hantavirus in the southwestern United States. **J Infect Dis** 1994; 169:1271-1280.
8. Childs JE, Mills JN, Glass FE. Rodent Borne Hemorrhagic Fever Viruses: A special risk for mammalogists? **J of Mammal** 1995; 76(3):664-680.
9. Delfraro A, Clara M, Tomé L, Achaval F, Levis S, Calderon G, Enria D, Lozano M, Russi J, Arbiza J. Yellow pigmy rice rat (*Oligoryzomys flavescens*) and hantavirus pulmonary syndrome in Uruguay. **Emerg Infect Diseases** 2003; 9(7): 846-852.
10. Drebot MA, Artsob H, Werker D. Hantavirus pulmonary syndrome in Canada, 1989-1999. **Can Commun Dis Rep** 2000; 26(8): 65-9.
11. Figueiredo LTM, Campos GM, Rodrigues FB. Síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavírus: aspectos epidemiológicos, clínicos, do diagnóstico laboratorial e do tratamento. **Rev Soc Bras Med Trop** 2001;34910: 13-23.
12. Fulhorst CF, Monroe MC, Salas RA, Duno G, Utrera A, Ksiazek TG, Nichol ST, de Manzione NM, Tovar D, Tesh RB. Isolation, characterization and geographic distribution of Cano Delgadito virus, a newly discovered South American hantavirus (family Bunyaviridae). **Virus Res** 1997; 51(2):159-71.
13. Glass GE, Childs JE, Korch GW, LeDuc JW. Association of intraspecific wounding with hantaviral infection in wild rats (*Rattus norvegicus*). **Epidemiol Infect** 1988; 101:459-72.
14. Hjelle B, Jenison S, Torrez-Martinez N, Yamada T, Nolte K, Zumwalt R, MacInnes K, Myers G. A novel hantavirus associated with an outbreak of fatal respiratory disease in southwestern United States: evolutionary relationships to known hantaviruses. **J Virol** 1994; 68(2):592-596.
15. Hjelle B, Anderson B, Torrez-Martinez N, Song W, Gannon WL, Yates TL. Prevalence and geographic genetic variation of hantaviruses of New World harvest mice (*Reithrodontomys*): Identification of a divergent genotype from a Costa Rican *Reithrodontomys mexicanus*. **Virology** 1995; 207(2):452-459.
16. Hjelle B, Lee SW, Song W, Torrez-Martinez N, Song JW, Yanagihara R, Gavrillovskaya I, Mackow ER. Molecular linkage of hantavirus pulmonary syndrome to the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*: Genetic characterization of the M genome of New York virus. **J Virol** 1995; 69(12):8137-8141.
17. Hjelle B, Goade D, Torrez-Martinez N, Lang-Williams M, Kim J, Harris RL, Rawlings JA. Hantavirus pulmonary syndrome, renal insufficiency and myositis associated with infection by Bayou hantavirus. **Clin Infect Dis** 1996; 23(3): 495-500.
18. Huang C, Campbell WP, Means R, Ackman DM. Hantavirus S RNA sequence from a fatal case of HPS in New York. **J Med Virol** 1996; 50(1):5-8.
19. Iversson LB, Travassos da Rosa APA, Rosa MDB, Lomar AV, Sasaki MGM, LeDuc JW. Infecção humana por hantavírus no sul e sudeste do Brasil. **The Lancet** 1994; 40(2):85-92.
20. Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, Williams RJ, Gryan RT, Mills JN, Peters CJ, Nichol ST. Laguna Negra Virus associated

- with HPS in western Paraguay and Bolivia. **Virology** 1997; 238(1):115-127.
21. Johnson AM, Souza LTM, Ferreira IB, Pereira LE, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ, Nichol ST. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. **J Med Virol** 1999; 59(4): 527-535.
 22. Katz G, Williams RJ, Burt MS, de Souza LT, Pereira LE, Mills JN, Suzuki A, Ferreira IB, Souza RP, Alves VA, Bravo JS, Yates TL, Meyer R, Shieh W, Ksiazek TG, Zaki SR, Khan AS, Peters CJ. Hantavirus Pulmonary Syndrome in the State of São Paulo, Brazil, 1993-1998. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2001;1(3):181-89.
 23. Khan AS, Spiropoulos CF, Morzunov S, Zaki SR, Kohn MA, Nawas SR, McFarland L, Nichol ST. Fatal illness associated with a new hantavirus in Louisiana. **J Med Virol** 1995; 46(3): 281-286.
 24. Khan AS, Khabbaz RF, Armstrong LR, Holman RC, Bauer SP, Graber J, Strine T, Miller G, Reef S, Tappero J, Rollin PE, Nichol ST, Zaki SR, Bryan RT, Chapman LE, Peters CJ, Ksiazek TG. Hantavirus pulmonary syndrome: The first 100 us cases. **J Infect Dis** 1996; 173(6): 1297-1303.
 25. Ksiazek TG, Peters CJ, Rollin PE, Zaki PE, Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Feldmann H, Sanchez A, Khan AS, Mahy BWJ, Wachsmuth K, Butler JC. Identification of a new north american hantavirus that causes acute pulmonary insufficiency. **Amer J of Trop Med and Hyg** 1995; 52:117-23.
 26. Ksiazek TG, Nichol ST, Mills JN, Groves MG, Wozniak A, McAdams S, Monroe MC, Johnson AM, Martin ML, Peters CJ, Rollin PE. Isolation, genetic diversity, and geographic distribution of Bayou virus (Bunyaviridae: hantavirus). **Am J Trop Med Hyg** 1997; 57(4):445-448.
 27. Lee HW, French GR, Lee PW, Baek LJ, Tsuchiya K, Foulke RS. Observations on natural and laboratory infection of rodents with the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. **Am J Trop Med Hyg** 1981; 30(2): 477-482.
 28. Levis S, Morzunov SP, Rowe JE, Enria d, Pini N, Calderon G, Sabattini M, St.Jeor SC. Genetic diversity and epidemiology of Hantaviruses in Argentina. **J Infect Dis** 1998; 177:529-538.
 29. Lopes N, Padula P, Rossi C, Lázaro ME, Franze-Fernandes MT. Genetic identification of a New Hantavirus causing Severe Pulmonary Syndrome in Argentina. **Virology** 1996; 220:223-226.
 30. Mendes, WS, Silva AAM, Aragão LFC, Aragão NJL, Raposo ML, Elkhoury MR, Suzuki A, Ferreira IB, Sousa LT, Panutti C. Hantavirus infection in Anajatuba, Maranhão, Brazil. **Rev Inst Med Trop** 2001; 43:237-240.
 31. Mills JN, Childs JE, Ksiazek TG, Peters CJ, Velleca WM. Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing. Atlanta: US Department of Health and Human Services 1995.
 32. Mills JN, Ksiazek TG, Ellis BA, Rollin PE, Nichol ST, Yates TL, Gannon WL, Craig EL, Engelthaler DM, Davis T, Tanda DT, Wyatt-Frampton J, Nichols CR, Peters CJ, Childs JE. Patterns of association with host and habitat: Antibody reactive with Sin Nombre virus in small mammals in the major biotic communities of the southwestern United States. **Am J Trop Med Hyg** 1997; 56(3): 273-284.
 33. Mills JN, Childs, JE. Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. **Emerg Infect Dis** 1998; 4:529-537.
 34. Monroe MC, Morzunov SP, Johnson AM, Bowen MD, Artsob H, Yates T, Peters CJ, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST. Genetic diversity and distribution of Peromyscus-borne hantaviruses in North America. **Emerg Infect Dis** 1999; 5(1): 7586Molina MG. Síndrome Pulmonar por Hantavirus, Una Enfermedad Transmitida por Roedores. **Revista Digital CENIAP HOY**. Número especial 2004. Maracay, Aragua, Venezuela. [acesso em 12 ago 2006]. Disponível em: <http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy>.
 36. Morzunov SP, Feldmann H, Spiropoulou CF, Semenova VA, Rollin PE, Ksiazek TG, Peters CJ, Nichol ST. A newly recognized virus associated with a fatal case of hantavirus pulmonary syndrome in Louisiana. **J Virol** 1995; 69(3): 1980-1983.
 37. Morzunov SP, Rowe JE, Ksiazek TG, Peters CJ, St Jeor SC, Nichol ST. Genetic analysis of the diversity and origin of hantaviruses in Peromyscus leucopus mice in North America. **J Virol** 1998; 72(1):5764.
 38. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs JE, Zaki S, Peters CJ. Genetic identification of a novel Hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness in the southwestern Unites States. **Science** 1993; 262:914-917.

39. Nuzum EO, Rossi CA, Stepheson EH, LeDuc JW. Aerosol transmission of Hantaan related virus to laboratory rats. **Amer J Trop Med Hyg** 1988; 38:636-640.
40. Organización Panamericana de la Salud. Cuaderno técnico 47. Hantavirus en las Américas: guía para el diagnóstico, el tratamiento, la prevención y el control. **Rev Esp Salud Pública** 1999; 73:647-70.
41. Parmenter RR, Brunt JW, Moore DI, Ernest S. The hantavirus epidemic in the Southwest Rodent population dynamics and the implications for transmission of hantavirus-associated adult respiratory distress syndrome (HARDS) in the Four Corners region. Sevillea LTER publication n° 41. Albuquerque, NM: University of New Mexico; 1993.
42. Pereira C. Sobre as "ratadas" no sul do Brasil e o ciclo vegetativo das taquaras. **Arq Inst Biol** 1941;12:175-200.
43. Pereira, LE, Souza, LTM, Souza, RP, Bisordi, I, Suzuki, A, Katz, G. Histórico da Vigilância Eco-epidemiológica do Hantavírus no Brasil. **Revista da CIP** 1999; 2(3):5-12.
44. Peters CJ. Hantavirus Pulmonary Syndrome in the Americas. En: Scheld WM, Craig WA, Hughes JB, eds. *Emerging Infections 2*. Washington, DC: ASM Press; 1998.
45. Pini N, Levis S, Calderón G, Ramirez J, Bravo D, Lozano E, Ripoll C, Jeor SS, Ksiazek TG, Barquez RM, Enria D. Hantavirus Infection in Humans and Rodents, Northwestern Argentina. **Emerging Infectious Diseases** 2003; 9(9):1070-1076.
46. Powers AM, Mercer DR, Watts DM, Guzman H, Fulhorst CF, Popov VL, Tesh RB. Isolation and genetic characterization of a hantavirus (Bunyaviridae: Hantavirus) from a rodent, *Oligoryzomys microtis* (Muridae), collected in northeastern Peru. **Am J Trop Med Hyg** 1999; 61(1): 92-98.
47. Ravkov EV, Rollin PE, Ksiazek TG, Peters CJ, Nichol ST. Genetic and serologic analysis of Black Creek Canal virus and its association with human disease and *sigmodon hispidus* infection. **Virology** 1995; 210(2):482-489.
48. Rawlings JA, Torrez-Martinez N, Neill SU, Moore GM, Hicks BN, Pichuantes S, Nguyen A, Bharadwaj M, Hjelle B. Cocirculation of multiple hantaviruses in Texas, with characterization of the small (S) genome of a previously undescribed virus of cotton rats (*Sigmodon hispidus*). **Am J Trop Med Hyg** 1996; 55(6):672-679.
49. Rollin PE, Ksiazek TG, Elliott LH, Ravkov EV, Martin ML, Morzunov S, Livingstone W, Monroe M, Glass G, Ruo S. Isolation of black creek canal virus, a new hantavirus from *Sigmodon hispidus* in Florida. **J Med Virol** 1995; 46(1):35-39.
50. Rosa ES, Mills JN, Padula PJ, Elkhoury MR, Ksiazek TG, Mendes WS, Santos ED, Araujo GC, Martinez VP, Rosa JF, Edelstein A, Vasconcelos PF. 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** 2005; 5(1):11-19.
51. Salazar-Bravo J, Armien B, Suzan G, Armien A, Ruedas LA, Avila M, Zaldivar Y, Pascale JM, Gracia F, Yates TL. Serosurvey of wild rodents for hantaviruses in Panama, 2000-2002. **J Wildl Dis** 2004; 40(1):103-9.
52. Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruses: A global Disease Problem. **Emerg Infect Dis** 1997; 3(2):95-104.
53. Schmaljohn C, Huggins J, Calisher CH. 1999. Laboratory and field safety. In: Lee HW, Calisher CH, Schmaljohn C, eds. *Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome*. Seoul, Korea: WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research (Hantaviruses), Asian Institute for Life Sciences; 1999: 191-198.
54. Silva MV, Vasconcelos MJ, Hidalgo NTR, Veiga APR, Canzian M, Marotto, PCF, Lima VCP. Hantavirus Pulmonary syndrome. Report of the first three cases in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Méd Trop** 1997; 39(4): 231-234.
55. Song JW, Baek LJ, Nagle JW, Schlitter D, Yanagihara R. Genetic and phylogenetic analyses of hantaviral sequences amplified from archival tissues of deer mice (*Peromyscus maniculatus nubiterrae*) captured in the eastern United States. **Arch Virol** 1996; 141(5):959-967.
56. Suzuki A, Bisordi I, Levis S, Garcia J, Pereira, LE, Souza RP, Sugahara TKN, Pini N, Enria D, Souza LTM. Araraquara and Juquitiba hantavirus in southern and southeastern Brazil: genetic identification of their rodent reservoirs. **Emerg Infect Dis** 2004; 10(12):2127-2134.
57. Toro J, Vega JD, Khan AS, Mills JN, Padula P, Terry W, Yadón Z, Valderrama R, Ellis BA, Pavletic C, Cerda R, Zaki S, Wun-Ju S, Meyer R, Tapia M, Mansilla C, Baro M, Vergara J.A, Concha M, Calderon G, Enria D, Peters C.J,

- Ksiazek T.G. An outbreak of Hantavirus Pulmonary Syndrome, Chile, 1997. **Emerg Infect Dis** 1998; 4(4):687-694.
58. Werker DH, Artsob H. Of mice and mostly men hantavirus pulmonary syndrome. **Canadian Medical Association Journal** 1998; 158:912-913.
59. Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, Palma RE, Vera I, Velasquez F, Baez E, Schmidt WE, Figueiroa RE, Peters CJ, Zaki SR, Khan AS, Ksiazek TG. An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome in western Paraguay. **Am J Trop Med Hyg** 1997; 57(3):274-82.
60. Zaki SR, Greer PW, Coffield LM, Goldsmith CS, Nolte KB, Foucar K, Feddersen RM, Zumwalt RE, Miller GL, Khan AS. Hantavirus pulmonary syndrome: Pathogenesis of an emerging infectious disease. **American Journal of Pathology** 1995; 146: 552-579.
61. Zaki SR, Khan AS, Goodman RA, Armstrong LR, Greer PW, Coffield LM, Ksiazek, TG, Rollin PE, Peters CJ, Khabbaz RF. Retrospective diagnosis of Hantavirus Pulmonary Syndrome, 1978-1993. **Arch Pathol Lab Med** 1996; 120:134-139.

Correspondência/Correspondence to:

Luis Eloy Pereira
Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos, do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Cerqueira César
Cep: 01246-902 – São Paulo/SP - Brasil
Tel.: (11) 3068-2901
E-mail: lupereira@ial.sp.gov.br

Informe Técnico

Introdução da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas no Instituto Adolfo Lutz

Introduction of conventional and real time PCR for laboratory diagnostic of bacterial meningitis at Instituto Adolpho Lutz

Laboratório de Meningites Bacterianas, da Seção de Imunologia, do Instituto Adolfo Lutz – IAL

Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – SES-SP

Introdução

As meningites bacterianas são um sério problema de saúde pública mundial. Estima-se que ocorram cerca de 170.000 mortes por ano no mundo, e entre 10% a 20% dos sobreviventes ainda adquiram seqüelas neurológicas irreversíveis (http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_bacterial/en/index2.html#introduction). Os principais agentes causadores da doença são *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae b*, este em menor proporção desde a introdução da vacina conjugada, no segundo semestre de 1999.

No Estado de São Paulo, entre 2000 e 2006, foram notificados 74.449 casos de meningite, mas somente 24,7% deles tiveram sua etiologia determinada. Dentre esses, 8.710 casos (11,7%) foram diagnosticados como doença meningocócica, 3.497 (4,7%) como meningite pneumocócica e 489 (0,6%) como meningite causada por Hib. Outros 14.990 casos (20%) foram considerados como de possível causa bacteriana, porém sem identificação do agente etiológico (http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/CVE_DAT.HTM).

É de extrema importância discriminar as meningites bacterianas, com a identificação do agente etiológico, pois permite: (I) o controle da doença pelas autoridades em saúde pública através de quimioprofilaxia e vacinação; (II) a introdução de terapia correta nos pacientes, uma vez que muitas cepas bacterianas, especialmente os pneumococos, apresentam resistência a múltiplos antibióticos; (III) o desenvolvimento de novas vacinas baseadas na distribuição epidemiológica das meningites, uma vez que a resposta imune é específica ao sorogrupo e/ou sorotipo da bactéria.

O diagnóstico laboratorial definitivo das meningites bacterianas exige o isolamento de bactérias por cultura do líquido cefalorraquidiano (LCR) e/ou

sangue. Entretanto, em torno de 50% dos casos suspeitos de meningite bacteriana não são confirmados por esta técnica, devido a problemas relacionados com a semeadura e transporte inadequado da amostra clínica e/ou uso de antibióticos antes da coleta do material. Métodos microbiológicos tradicionais, como a coloração de Gram ou a aglutinação por látex, estão disponíveis para a detecção de alguns agentes, mas não são suficientemente sensíveis para detectar esses agentes quando em pequenas concentrações, como geralmente encontrados em amostras clínicas de pacientes submetidos à antibioticoterapia.

Método da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico

A PCR, nos últimos anos, é amplamente aplicada em centenas de procedimentos laboratoriais e considerada como o método de escolha no diagnóstico e caracterização molecular de diversos agentes bacterianos. A principal vantagem desta metodologia em relação à cultura é a redução do tempo de obtenção de resultados e a detecção do microrganismo sem necessidade de um cultivo prévio. Além disso, a PCR apresenta maior sensibilidade e especificidade que a cultura, representando um método laboratorial rápido e seguro.

Duas versões do método da PCR são bem conhecidas e utilizadas em laboratórios de diagnóstico: a PCR convencional e a PCR em tempo real, uma modificação da técnica tradicional. A PCR em tempo real identifica o DNA alvo com maior sensibilidade, uma vez que a detecção da amplificação é feita através da captação de fluorescência. Esta técnica apresenta também maior especificidade devido à utilização de uma sonda específica para o fragmento alvo na reação. A amplificação e a detecção do DNA são realizadas simultaneamente em um sistema fechado, dispensando procedimentos adicionais

como a corrida eletroforética dos produtos em gel de agarose e fotodocumentação. Com a eliminação destas etapas, os resultados são obtidos mais precocemente pela PCR em tempo real quando comparada à convencional.

A escolha do método dependerá de vários fatores como: equipamento disponível, demanda de exames, custo e pessoal técnico especializado. As duas versões da PCR diferem em vários aspectos, como sensibilidade, especificidade, limite mínimo de detecção e equipamentos requeridos, entre outros. As principais características comparativas destes dois métodos estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Características dos métodos de PCR convencional e em tempo real padronizados no IAL.

Características	PCR convencional	PCR em tempo real
Equipamentos necessários	Três (termociclador; sistema de eletroforese: cuba+fonte de alimentação; sistema de fotodocumentação)	Um único equipamento (amplificação e detecção simultânea)
Especificidade	Menor especificidade em relação à PCR em tempo real	Maior especificidade em relação à PCR convencional devido à presença de uma sonda
Sensibilidade ¹	Limite de detecção entre 2 a 20 pg/reação	Limite de detecção em torno de 200 fg/reação (10 a 100 x maior)
Sistema	Não-automatizado	Automatizado
Resultados	Não são expressos em números	São expressos em números
Interpretação dos resultados	Baseado na observação de banda em gel de agarose	Baseado em valores de Ct, determinados por um software
Quantificação do DNA	Não permite	Permite
Geração de resíduos tóxicos	Sim	Não
Tempo de execução	6 a 8 horas	2 a 3 horas
N. amostras por corrida	Depende da capacidade do termociclador	42 amostras em duplicata + controles
Custo	Menor em relação ao PCR em tempo real	Maior em relação ao PCR convencional
Limitações do método (proposto pelo IAL) ¹	podem detectar eventuais falsos positivos para Spn ³	Não detectam cepas de Hi ² dos sorotipos e/f e cepas não-capsuladas; podem detectar eventuais falsos positivos para Spn ³

1. Dados do IAL

2. *Haemophilus influenzae*

3. *Streptococcus pneumoniae*

Padronização da PCR convencional e em tempo real no IAL

O Instituto Adolfo Lutz (IAL) padronizou as metodologias de PCR convencional e em tempo real para a detecção, em amostras clínicas, dos três principais agentes causadores de meningites bacterianas (Men, Spn e Hi), baseados em trabalhos anteriormente publicados por Carvalho¹, Corless², Forbs³, Mothershed⁴ e Taha⁵. Nestes métodos os ensaios foram padronizados no formato triplex para a detecção de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*.

Padronização da PCR convencional

A metodologia de PCR convencional padronizada no IAL baseia-se na detecção simultânea de três

genes: o *crgA*, envolvido no processo de adesão de *N. meningitidis* à mucosa de orofaringe humana; o *lytA*, responsável pela produção de autolisina em *S. pneumoniae*; e o *ompP2*, responsável por uma proteína de membrana externa em *H. influenzae*.

Algumas restrições para esta metodologia são:

I) como as cepas de *H. aegyptius* também são portadoras do gene *ompP2*, a detecção deste gene poderia ser um resultado positivo para *H. influenzae* ou *H. aegyptius*, entretanto, o *H. aegyptius* é raramente encontrado no líquido, sendo mais freqüente no soro e apenas nos casos de febre purpúrica brasileira e

II) como algumas cepas de *Streptococcus* do grupo viridans possuem o gene *lytA*, a detecção da presença deste poderia indicar um resultado positivo para *S. pneumoniae* ou para *Streptococcus* do grupo viridans, porém, cepas do grupo viridans com o gene *lytA* não foram, até o momento, isoladas de LCR e/ou soro em nossos laboratórios.

Padronização da PCR em tempo real

A PCR em tempo real proposta pelo IAL baseia-se na detecção simultânea de três genes na mesma reação: o gene *ctrA*, que está envolvido no processo de transporte da cápsula polissacarídica através da membrana externa de *N. meningitidis*; o gene *lytA*, responsável pela produção da autolisina em *S. pneumoniae*; e o gene *bexA*, responsável pela expressão da cápsula polissacarídica em *H. influenzae*.

As restrições para esta metodologia são:

I) o gene *bexA*, alvo para a detecção de *H. influenzae*, apresenta diferenças estruturais entre os seis sorotipos de *H. influenzae*. Neste ensaio, a sonda (probe) utilizada irá detectar somente cepas de *H. influenzae* dos sorotipos "a, b, c, d". As cepas dos sorotipos "e" e "f", bem como as não-tipáveis, não serão detectadas por esse método;

II) o gene *bexA* também não está presente em cepas não-capsuladas de Hi e

III) como algumas cepas de *Streptococcus* do grupo viridans possuem o *lytA*, a detecção da presença deste gene poderia ser um resultado positivo para Spn ou *Streptococcus* do grupo viridans, como ocorre na PCR convencional.

3.3. Padronização da PCR para genogrupagem de *N. meningitidis*

Os sorogrupos de *N. meningitidis* são baseados em diferenças antigênicas de seus polissacarídeos capsulares e, geralmente, caracterizados pela reação de aglutinação em lâmina com diferentes anti-

soros policlonais específicos para cada sorogrupo. Estes sorogrupos também podem ser caracterizados diretamente no LCR e no soro pela contraimunoelectroforese (CIE) e pelo teste de aglutinação do látex.

O ensaio de PCR multiplex pode ser utilizado como um método indireto para caracterizar estes sorogrupos diretamente no LCR e soro. Ele se baseia na detecção dos genes específicos relacionados à biossíntese dos polissacarídeos capsulares responsáveis pelos diferentes sorogrupos.

O IAL também padronizou a PCR para genogrupagem de *N. meningitidis*, tanto em versão convencional quanto em tempo real, com base em trabalhos publicados por Taha⁵ e Mothershed⁴ *et al.*

Para a genogrupagem da *N. meningitidis* pela PCR convencional são pesquisados cinco genes específicos para os diferentes sorogrupos: genes *orf2* para o sorogrupo A, *siaD* para os sorogrupos B e C, *synF* para o sorogrupo W135 e *synG* para o sorogrupo Y. Na PCR em tempo real, a genogrupagem de *N. meningitidis* é baseada na detecção de seis genes específicos para os sorogrupos A (*orf2*), B e C (*siaD*), W135 (*synF*), Y (*synG*) e X (*xcbB*).

As duas metodologias são aplicadas somente em amostras de LCR e/ou soro que apresentarem previamente resultados positivos para a presença dos genes *crgA* ou *ctrA*. Embora não incluam iniciadores para a detecção de genes dos 12 sorogrupos de *N. meningitidis* existentes, as metodologias padronizadas englobam, pelo menos, os cinco sorogrupos prevalentes no mundo. A limitação do método consiste na falha da determinação do genogrupo em cerca de 20% das amostras previamente positivas para o gene *ctrA/crgA*. Entretanto, até o momento não foram encontradas restrições para o método.

Parâmetros avaliados

Especificidade

As metodologias de PCR convencional e em tempo real foram testadas contra um painel de 300 cepas pertencentes a 32 espécies diferentes. Ambos os métodos apresentaram especificidade e sensibilidade de 100%.

Limite mínimo de detecção de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*

O limite mínimo de detecção da PCR depende do método utilizado. Para a PCR convencional os limites foram de 2 pg para *N. meningitidis* (aproximadamente 800 cópias do DNA alvo) e de 20 pg para *S. pneumoniae* e *H. influenzae* (em torno de 8.000 cópias do DNA alvo) na amostra. Por outro lado, os limites mínimos de detecção para a PCR em tempo

real foram de 200 fg (aproximadamente 80 cópias do DNA alvo) para os três agentes (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*), sendo 10 a 100 vezes maior quando comparado com a PCR convencional.

Limite mínimo de detecção na genogrupagem de *N. meningitidis*

O limite mínimo de detecção da PCR de genogrupagem também vai depender do método utilizado. Para a PCR convencional os limites foram de 20 pg para *N. meningitidis* dos sorogrupos A, B e C (em torno de 8.000 cópias do DNA alvo) e de 2 ng para os sorogrupos W135 e Y (80.000 cópias do DNA alvo) na amostra.

Os limites mínimos de detecção para a PCR de genogrupagem em tempo real foram de 200 fg (em torno de 80 cópias), 2 pg (800 cópias), 20 pg (8.000 cópias), 200 pg (80.000 cópias) e de 2 fg (0,8 cópia) para *N. meningitidis* dos sorogrupos A e C, B, W135, Y e X, respectivamente.

Dados preliminares do uso da PCR no diagnóstico das meningites bacterianas

Dados preliminares mostraram um aumento na positividade para *N. meningitidis* em relação à CIE de 31% com o emprego da PCR convencional e em tempo real. Se considerarmos os casos positivos para *S. pneumoniae* detectados pela PCR, a positividade total em relação à CIE aumenta em torno de 50% com o uso da PCR convencional e em tempo real.

Solicitação do exame (PCR para meningites bacterianas)

A introdução e a aplicação desta nova metodologia visam reduzir o número de casos de meningite bacteriana com agente etiológico não-determinado. O IAL incluiu esta PCR no seu painel de exames laboratoriais; entretanto, em virtude de sua complexidade e alto custo, o método será introduzido na rede hospitalar de maneira controlada.

Em um primeiro momento, o IAL irá oferecer este exame apenas para dois hospitais da rede pública: o Instituto de Infectologia Emílio Ribas e o Hospital Santa Marcelina Itaquera. Os dois foram selecionados pelo IAL em conjunto com a Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória (DDTR), do Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac" (CVE), e o Subsistema de Vigilância Epidemiológica em Âmbito Hospitalar (SVEAH), órgãos da Coordenadoria de Controle de Doenças, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD/SES-SP). Para tanto, levou-se em consideração a demanda e a importância destes hospitais no diagnóstico e no tratamento das meningites bacterianas.

O exame de líquido e soro por PCR para a pesquisa de *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *S. pneumoniae* encontra-se disponível para as duas unidades desde o dia 2 de abril de 2007.

Condições da amostra

A mesma amostra destinada à CIE poderá ser utilizada para a PCR, devendo apresentar as seguintes condições:

I. O volume ideal de 600 µL. Amostras com volumes menores que o ideal serão processadas, entretanto, o resultado do exame poderá ser prejudicado e esta observação constará no laudo;

II. Apresentar características quimiocitológicas e/ou clínica compatíveis com as de meningite bacteriana;

III. Estar acompanhada do formulário de requisição do exame devidamente preenchido, de forma legível, de preferência feito na ficha do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (Sinan). Este formulário deverá conter carimbo ou nome por escrito ou impresso do médico, sua assinatura ou rubrica e seu número no Conselho Regional de Medicina (CRM);

IV. Ser encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz, através do Setor de Coleta, e registrada com o número IAL;

V. Ser coletada em condições assépticas e estar devidamente acondicionada em tubo ou frasco íntegro (não esteja trincado, quebrado ou rachado).

VI. Ser identificado, de forma legível, com o nome do paciente e tipo de amostra (LCR ou soro), o tubo/frasco contendo a amostra e

VII. Ser encaminhada no gelo, no máximo 24 horas após a coleta. As amostras também poderão ser congeladas por longos períodos a -20°C ou -70°C e encaminhadas ao IAL congeladas.

Caso a amostra não esteja em conformidade com os critérios estabelecidos acima, a mesma será rejeitada e devolvida para a unidade requisitante.

Processamento das amostras

As amostras serão processadas em no mínimo 12 horas após seu recebimento no laboratório.

Apresentação de resultado

Os resultados do exame serão encaminhados na

forma de laudo para a unidade requisitante. No laudo constará o seguinte resultado:

1. Presença de gene compatível com *N. meningitidis* ou *S. pneumoniae* ou *H. influenzae* por PCR convencional ou em tempo real.

2. Ausência de genes compatíveis com *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* por PCR convencional ou em tempo real.

Ou para a genogrupagem de *N. meningitidis*:

1. Presença de gene compatível com sorogrupo A, B, C, W135 ou Y de *N. meningitidis* por PCR convencional ou em tempo real.

2. Ausência de genes compatíveis com os sorogrupos A, B, C, W135 e Y de *N. meningitidis* por PCR convencional ou em tempo real.

Referências bibliográficas

1. Carvalho MGS, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, Steigerwalt A, Whaley M, Facklam RR, Fields B, Carlone J, Ades EW, Dagan R, Sampson JS. Evaluation and Improvement of Real-Time PCR detection assay to *lytA*, *ply*, and *psa* genes for detection of pneumococcal DNA. 2007. **J Clin Microbiol** *In press*.
2. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septemia using Real-Time PCR. **J Clin Microbiol** 2001; 39:1553-1558.
3. Forbes KJ, Bruce KD, Ball A, Pennington TH. Variation in length and sequence of porin (*ompP2*) alleles of non-capsulate *Haemophilus influenzae*. **Mol Microbiol** 1992; 6: 2107-2112.
4. Mothershed EA, Sacchi CT, Whitney AM, Barnett G, Ajello GW, Schmink S, Mayer LW, Phelan M, Taylor TH, Bernhardt AA, Rosenstein NE, Popovic T. Use of real-time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. **J Clin Microbiol** 2004; 42: 320-328.
5. Taha MK. 2000. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. **J Clin Microbiol** 38: 855-857.

Correspondência/Correspondence to:

Cláudio T. Sacchi
Laboratório de Meningites Bacterianas, Seção de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Cerqueira César
CEP: 01246-902 – São Paulo/SP – Brasil
Tel.: (11) 3068-2899
E-mail: csacchi@ial.sp.gov.br

Instruções aos Autores

O **Boletim Epidemiológico Paulista (Bepa)** publicação mensal da Coordenadoria de Controle de Doenças, órgão da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD/SES-SP) veicula artigos relacionados aos agravos à saúde pública ocorridos nas diversas áreas de controle, assistência e diagnóstico laboratorial do Sistema Único de Saúde de São Paulo (SUS-SP). Além de disseminar informações entre os profissionais de saúde de maneira rápida e precisa, o Bepa tem como objetivo incentivar a produção de trabalhos que subsidiem as ações de prevenção e controle de doenças na rede pública, apoiando, ainda, a atuação dos profissionais do sistema de saúde privado, promovendo a atualização e o aprimoramento de ambos.

Os documentos que podem ser publicados neste boletim estão divididos nas seguintes categorias:

1. **Artigos originais** – destinados à divulgação de resultados de pesquisa original inédita, que possam ser replicados e/ou generalizados. Devem ter de 2.000 a 4.000 palavras, excluindo tabelas, figuras e referências.

2. **Revisão** – Avaliação crítica sistematizada da literatura sobre assunto relevante à saúde pública. Devem ser descritos os procedimentos adotados, esclarecendo a delimitação e limites do tema. Extensão máxima: 5.000 palavras.

3. **Comunicações breves** – São artigos curtos destinados à divulgação de resultados de pesquisa. No máximo 1.500 palavras, uma tabela/figura e cinco referências.

4. **Informe epidemiológico** – Textos que têm por objetivo apresentar ocorrências relevantes para a saúde coletiva, bem como divulgar dados dos sistemas de informação sobre doenças e agravos. Máximo de 3.000 palavras.

5. **Informe técnico** – Trabalhos que têm por objetivo definir procedimentos, condutas e normas técnicas das ações e atividades desenvolvidas no âmbito da saúde coletiva. No máximo 5.000 palavras.

A estrutura dos textos produzidos para a publicação deverá adequar-se ao estilo Vancouver, cujas linhas gerais seguem abaixo.

• **Página de identificação** – Título do artigo, conciso e completo, em Português e Inglês; nome completo de todos os autores; indicação da instituição à qual cada autor está afiliado; indicação do autor responsável pela troca de correspondência; se subvencionado, indicar nome da agência de fomento que concedeu o auxílio e respectivo nome do processo; se foi extraído de dissertação ou tese, indicar título, ano e instituição em que foi apresentada.

• **Resumo** – Todos os textos, à exceção dos

• **Informes técnicos**, deverão ter resumo em Português e em Inglês (*Abstract*), dimensionado entre 150 palavras (**comunicações breves**) e no máximo 250 palavras (**artigos originais, revisões, atualizações e informes epidemiológicos**). Para os artigos originais, o resumo deve destacar os propósitos do estudo, procedimentos básicos adotados (seleção de sujeitos de estudo ou animais de laboratório, métodos analíticos e observacionais), principais descobertas e conclusões. Devem ser enfatizados novos e importantes aspectos do estudo ou das observações. Uma vez que os resumos são a principal parte indexada do artigo em muitos bancos de dados eletrônicos, e a única parte que alguns leitores lêem, os autores precisam lembrar que eles devem refletir, cuidadosamente, o conteúdo do artigo. Para os demais textos, o resumo deve ser narrativo, mas com as mesmas informações.

• **Descritores (unitermos ou palavras-chave)** – Seguindo-se ao resumo, devem ser indicados no mínimo três e no máximo dez descritores do conteúdo, que têm por objetivo facilitar indexações cruzadas dos textos e podem ser publicados juntamente com o resumo. Em Português, os descritores deverão ser extraídos do vocabulário “Descritores em Ciências em Saúde” (DeCS), da Bireme. Em Inglês, do “Medical Subject Headings” (Mesh). Caso não sejam encontrados descritores adequados à temática abordada, termos ou expressões de uso corrente poderão ser empregados.

• **Introdução** – Contextualiza o estudo, a natureza dos problemas tratados e sua significância. A introdução deve ser curta, definir o problema estudado, sintetizar sua importância e destacar as lacunas do conhecimento abordadas.

• **Metodologia (Métodos)** – A metodologia deve incluir apenas informação disponível no momento em que foi escrito o plano ou protocolo do estudo; toda a informação obtida durante a condução do estudo pertence à seção de resultados. Deve conter descrição, clara e sucinta, acompanhada da respectiva citação bibliográfica, dos procedimentos adotados, a população estudada (universo e amostra), instrumentos de medida e, se aplicável, método de validação e método estatístico.

• **Resultados** – Devem ser apresentados em seqüência lógica no texto, tabelas e figuras, colocando as descobertas principais ou mais importantes primeiro. Os resultados encontrados devem ser descritos sem incluir interpretações e/ou comparações. Sempre que possível, devem ser apresentados em tabelas e figuras auto-explicativas e com análise estatística, evitando-se sua repetição no texto.

- **Discussão** – Deve enfatizar os novos e importantes aspectos do estudo e as conclusões que dele derivam, sem repetir material colocado nas seções de introdução e resultados. Deve começar com a apreciação das limitações do estudo, seguida da comparação com a literatura e da interpretação dos autores, apresentando, quando for o caso, novas hipóteses.

- **Conclusão** – Traz as conclusões relevantes, considerando os objetivos do trabalho e formas de continuidade. Se tais aspectos já estiverem incluídos na discussão, a conclusão não deve ser escrita.

- **Referências bibliográficas** – A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores.

- **Citações bibliográficas no texto, tabelas e figuras:** deverão ser colocadas em ordem numérica, em algarismo arábico, sobrescrito, após a citação, constando da lista de referências bibliográficas. Exemplo:

“Os fatores de risco para a infecção cardiovascular estão relacionados à imunocompetência do hospedeiro¹.”

- **Referências bibliográficas:** devem ser numeradas consecutivamente, obedecendo à ordem em que aparecem pela primeira vez no texto, de acordo com o estilo Vancouver. A ordem de citação no texto obedecerá esta numeração. Até seis autores, citam-se todos os nomes; acima disso, apenas os seis primeiros, seguidos da expressão em Latim “*et al*”. É recomendável não ultrapassar o número de 30 referências bibliográficas por texto.

- A) Artigos de periódicos** – As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados devem estar de acordo com o *Index Medicus*, e marcadas em negrito.

Exemplo:

1. Ponce de Leon P; Valverde J e Zdero M. Preliminary studies on antigenic mimicry of *Ascaris Lumbricoides*. **Rev Lat-amer Microbiol** 1992; 34:33-38.

2. Cunha MCN, Zorzatto JR, Castro LLC. Avaliação do uso de Medicamentos na rede pública municipal de Campo Grande, MS. **Rev Bras Cien Farmacêuticas** 2002; 38:217-27.

- B) Livros** A citação de livros deve seguir o exemplo abaixo:

3. Medronho RA. Geoprocessamento e saúde: uma nova abordagem do espaço no processo saúde-doença. Primeira edição. Rio de Janeiro: Fiocruz/CICT/NECT.

- C) Capítulos de livro** – Já ao referenciar capítulos de livros, os autores deverão adotar o modelo a seguir:

4. Arnau JM, Laporte JR. Promoção do uso racional de medicamentos e preparação de guias farmacológicos. *In*: Laporte JR, Tognoni G, Rozenfeld

S. Epidemiologia do medicamento: princípios gerais. São Paulo: Hucitec; Rio de Janeiro: Abrasco; 1989.

D) Dissertações e teses:

5. Moreira MMS. Trabalho, qualidade de vida e envelhecimento [dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública; 2000. p. 100.

E) Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

6. Barboza *et al*. Descentralização das políticas públicas em DST/Aids no Estado de São Paulo. *In*: III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; 2004 ago; São Paulo: Rev IAL. P. 34 [resumo 32-SC].

F) Periódicos e artigos eletrônicos:

7. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Síntese de indicadores sociais 2000. [Boletim on-line]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> [2004 mar 5]

G) Publicações e documentos de organizações governamentais:

8. Brasil. Decreto 793, de 5 de abril de 1993. Altera os Decretos 74.170, de 10 de junho de 1974, e 79.094, de 5 de janeiro de 1977, que regulamentam, respectivamente, as Leis 5991, de 17 de janeiro de 1973, e 6360, de 23 de setembro de 1976, e dá outras providências. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 6 abr 1993. Seção 1. p. 4397.

9. Organización Mundial de la Salud (OMS). Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do Committee of Medical Journals Editors (*Grupo Vancouver*) (<http://www.cmje.org>).

Tabelas – Devem ser apresentadas em folhas separadas, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que forem citadas no texto. A cada uma deve ser atribuído um título breve, **NÃO SE UTILIZANDO TRAÇOS INTERNOS HORIZONTAIS OU VERTICAIS**. Notas explicativas devem ser colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título.

Quadros – São identificados como tabelas, seguindo uma única numeração em todo o texto.

Figuras – Fotografias, desenhos, gráficos etc., citados como figuras, devem ser numerados consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram mencionados no texto, por número e título abreviado no trabalho. As legendas devem ser apresentadas em folha à parte; as ilustrações devem ser suficientemente claras para permitir sua reprodução. Não são permitidas figuras que representem os mesmos dados.