



Leptospiras patogênicas em criações zootécnicas da região da subprefeitura Campo Limpo, Município de São Paulo e suas possíveis implicações com a epidemiologia humana da doença

André Luiz de Arruda

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Orientadora: Profa. Dra. Ana Eugênia de Carvalho Campos.
Co-orientadora: Profa. Dra. Solange Papini.

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Arruda, André Luiz de.

Leptospiras patogênicas em criações zootécnicas da região da Subprefeitura Campo Limpo, Município de São Paulo e suas possíveis implicações com a epidemiologia humana da doença. / André Luiz de Arruda. – São Paulo, 2015.

55 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.
Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Ana Eugênia de Carvalho Campos.

Versão do título para o inglês: Pathogenic *Leptospira* in animal of livestock from region Subprefecture of Campo Limpo, São Paulo city, and their possible implications for human disease epidemiology.

1. Agricultura urbana 2. Leptospirose 3. Roedores 4. Zoonoses 5. Contaminação ambiental I. Arruda, André Luiz de II. Campos, Ana Eugênia de Carvalho III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2015/011



**SECRETARIA DE AGRICULTURA E
ABASTECIMENTO**
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS
AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo – SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br
FOLHA DE APROVAÇÃO



André Luiz de Arruda

Título: Leptospiras patogênicas em criações zootécnicas da região da subprefeitura Campo Limpo, Município de São Paulo e suas possíveis implicações com a epidemiologia humana da doença

Orientadora: Profª. Drª. Ana Eugênia de Carvalho Campos

Co-orientadora: Profª. Drª. Solange Papini

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luzia de Fátima Óla e José Felix de Arruda, por todo apoio desde sempre.

Ao Dr. Eduardo de Masi, amigo que sem sua ajuda não seria possível o ingresso ao mestrado, sugestões, incentivo e ensinamentos.

À Dra. Lia Nakagawa, por toda ajuda com a manutenção do Biotério e com o suporte nas capturas dos roedores.

Ao Dr. Ricardo Harakava, pelos ensinamentos e orientações com as técnicas de biologia molecular, tem minha grande admiração.

À Amanda Oliveira, pela amizade, pela ajuda com a extração de DNA e com a PCR.

Ao Dr. Wagner Campos, pela ajuda e ensinamentos com a extração de DNA dos rins dos roedores e na amplificação.

À Dra. Rosa Piatti, por tirar dúvidas em relação a PCR voltada ao extraído do solo.

À MSc. Vanessa Castro, por toda a parte de sorologia, sempre a disposição a me ajudar e por todos os ensinamentos, fundamentais para minha dissertação.

À Dra. Eliana Villa Lobos, por me ensinar a coletar sangue de aves, procedimento indispensável.

À Dra. Cláudia Del Fava, professora e amiga, foi incansável quando precisei aprender a necropsia e eutanásia de roedores.

À Dra. Eliana Scarcelli, por todas as sugestões a banca de ingresso ao curso de Pós Graduação e na qualificação.

À Dra. Eliana, Regina e Carolina do Laboratório de Ecologia de Agroquímicos do Instituto Biológico (IB) pelos ensinamentos e apoio com as coletas e processamento de solo.

À Gerente Ambiental da Supervisão de Vigilância em Saúde (SUVIS) do Campo Limpo, Patrícia Peixoto de Oliveira, por toda ajuda e compreensão.

À médica veterinária da SUVIS Campo Limpo, Juliane C. B. A. Ferreira, pela ajuda e parceria nas coletas de sangue dos animais de criação.

Aos agentes de saúde da SUVIS Campo Limpo, Amanda Rocha, Bruno Oliveira, Edivaldo, Gedeilson, Talita Tavares, Roselaine Sonoda, Marcio Lirman, Solange, Cícero, Júlio, Zilda Soares, Cintia e Luci pela amizade e pela ajuda em campo e companheirismo. Em especial Marcos Aurélio, Milton Inácio e Wilson Soares, fizeram parte incansavelmente de todas as etapas em campo e na eutanásia e necropsia dos roedores.

Aos técnicos da SUVIS Campo Limpo Dra. Fátima, Deborah Ferrari, Sônia Lira e Marcelo, por ensinamentos, sugestões e pela compreensão.

Ao Cícero, que tenho carinho de filho, por ter cortado as iscas para captura dos roedores.

Ao meu primo, Rodrigo, pela com a formatação do meu projeto para o ingresso ao curso de Pós Graduação.

Ao coordenador, Dr. Marcelo Eiras, a secretária, Elisângela Lopes, e a todos os professores da Pós Graduação do Instituto Biológico.

Aos meus colegas da Pós Graduação, amigos, pessoas que adorei conhecer, pelos momentos de descontrações.

À supervisora da SUVIS Campo Limpo, Satiko Sato Yoshikawa

Agradecimentos especiais

Às minhas orientadoras, Dra. Ana Eugênia de Carvalho Campos e Dra. Solange Papini, as quais, me sinto honrado ter sido aluno, pela amizade, por todos os ensinamentos, apoio, paciência, carinho e orientações. Muito obrigado por terem me aceito como aluno.

ARRUDA, A.L. **LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS EM CRIAÇÕES ZOOTÉCNICAS DA REGIÃO DA SUBPREFEITURA CAMPO LIMPO, MUNICÍPIO DE SÃO PAULO E SUAS POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES COM A EPIDEMIOLOGIA HUMANA DA DOENÇA.** São Paulo. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico.

RESUMO

Os roedores são os principais reservatórios das bactérias do gênero *Leptospira*, agente causador da leptospirose, importante zoonose que leva a óbito aproximadamente 10% das pessoas infectadas. Em quase todos os animais de sangue quente, após a infecção aguda (leptospirose), pode haver a infecção crônica (leptospiremia) que gera infertilidade e aborto. Este trabalho teve como objetivo geral verificar a presença de *Leptospira* spp. em animais de criação, em roedores e nas matrizes ambientais de solo e água em áreas de agricultura urbana. Os estudos foram realizados nos três distritos administrativos da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, com alto nível de infestação de roedores, que foram capturados por meio de armadilhas tipo Tomahawk®. A sorologia de 70 animais de criação demonstrou que 48,6% foram sororeagentes para leptospirose, inferindo-se que os diferentes sorovares de *Leptospira* causadoras da doença estão amplamente disseminados nas áreas avaliadas, com predominância para Icterohaemorrhagiae, sorovar fortemente relacionado à infecção humana e o mais prevalente nos roedores. Um número expressivo de aves foi sororeagente para *Leptospira* spp., também, para o sorovar Icterohaemorrhagiae. Foram capturados 35 roedores com prevalência de *R. norvegicus*, que foi a espécie mais frequente com positividade da bactéria pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). O tamanho, idade e sexo de *R. norvegicus* não influenciaram a positividade para a presença da bactéria *Leptospira*. Não foi possível verificar a relação entre as matrizes solo e água contaminados com os animais de criação infectados, uma vez que a técnica de PCR analisa amostras muito pequenas e que não espelham o que ocorre na área como um todo. Os casos de leptospirose humana dentro do raio de 500m podem estar relacionados com as criações de animais infestadas por roedores.

Palavras-chave: agricultura urbana, leptospirose, roedores, zoonoses, contaminação ambiental.

ABSTRACT

Rodents are the main reservoirs of bacteria of the genus *Leptospira*, causative agent of leptospirosis, an important zoonotic disease that leads to death around 10% of infected humans. In almost all warm-blooded animals, after acute infection (leptospirosis), there may be a chronic infection (leptospiemia) that generates infertility and abortion. This work aimed to verify the presence of *Leptospira* spp. on livestock, rodents and environmental matrices of soil and water in areas of urban agriculture. The studies were conducted in the three administrative districts of Subprefecture Campo Limpo, São Paulo, with a high infestation of rodents, which were captured by Tomahawk® traps. Serology of 70 livestock showed that 48.6% were serum reactive for leptospirosis, and that the different *Leptospira* serovars causing the disease are widespread in the evaluated areas, predominantly Icterohaemorrhagiae serotype closely related to human infection is the most prevalent in rodents. A significant number of poultry was serum reactive for *Leptospira* also to the serovar Icterohaemorrhagiae. Thirty five rodents were captured with a prevalence of *R. norvegicus*, which was the most common species with positivity of bacteria by the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). The size, age and sex of *R. norvegicus* did not influence positively for the presence of *Leptospira*. It was not possible to relate the relationship between the matrices of contaminated ground and water with infected livestock, since for PCR analyzes very small samples are used which do not reflect what happens in the area as a whole. Cases of human leptospirosis within the 500m radius may be related to the livestock infested by rodents. .

Key-words: urban agriculture, leptospirosis, rodents, zoonoses, environmental contamination.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mapa do Município de São Paulo com os três Distritos Administrativos da Subprefeitura Campo Limpo em destaque. | 9 |
| Figura 2 – Área de estudo denominada como A, no Distrito Administrativo 17, Campo Limpo, São Paulo, SP. | 11 |
| Figura 3 – Área de estudo denominada como B, no Distrito Administrativo 85, Campo Limpo, São Paulo, SP. | 11 |
| Figura 4 – Área de estudo denominada como C, no Distrito Administrativo 85, Campo Limpo, São Paulo, SP. | 12 |
| Figura 5 – Área de estudo denominada como D, no Distrito Administrativo 19, Campo Limpo, São Paulo, SP. | 12 |
| Figura 6 – Área de estudo denominada como E, no Distrito Administrativo 19, Campo Limpo, São Paulo, SP. | 13 |
| Figura 7 – Área de estudo denominada como F, no Distrito Administrativo 19, Campo Limpo, São Paulo, SP. | 13 |
| Figura 8 – Área de estudo denominada como G, no Distrito Administrativo 19, Campo Limpo, São Paulo, SP. | 14 |
| Figura 9 – Área de estudo denominada como H, no Distrito Administrativo 19, Campo Limpo, São Paulo, SP. | 14 |
| Figura 10 – Área de estudo denominada como I, no Distrito Administrativo 19, Campo Limpo, São Paulo, SP. | 15 |
| Figura 11 - <i>Rattus norvegicus</i> capturado em armadilha tipo Tomahawk®. | 17 |
| Figura 12 – Rato acondicionado em caixa plástica para transporte. | 18 |
| Figura 13 – Trado. | 20 |
| Figura 14 – Coleta de solo com trado. | 21 |
| Figura 15 – Água empoçada usada para dessedentação de animais de criação. | 22 |
| Figura 16 - Concha adaptada para coleta de água de dessedentação de animais. | 23 |
| Figura 17 – Resultados obtidos pelo questionário aplicado aos proprietários das áreas estudadas quanto à infraestrutura das propriedades. | 27 |
| Figura 18 – Duas amostras de DNA de rins de roedores e o controle positivo, amplificação que gerou um fragmento de 423pb que foram confirmados por gel de agarose 0,8%. | 32 |
| Figura 19 – Presença e ausência de <i>Leptospira</i> spp. em amostras de água das áreas de estudo na região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP, 2015. | 36 |

| | |
|--|----|
| Figura 20 – Mapa da área A com nenhum caso de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. | 38 |
| Figura 21 - Mapa da área B com os caso de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. Um caso em 2013 e um caso em 2014 | 38 |
| Figura 22 - Mapa da área C com os casos de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. Dois casos em 2014 | 39 |
| Figura 23 - Mapa da área D com um caso de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. Um caso em 2014 | 39 |
| Figura 24 - Mapa da área E com os casos de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. Um caso em 2013 e um em 2014 | 40 |
| Figura 25 - Mapa da área F com nenhum caso de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. | 40 |
| Figura 26- Mapa da área G com os casos de leptospirose em um raio de 500m humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. Um caso em 2013 e um caso em 2014 | 41 |
| Figura 27 - Mapa da área H com os casos de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. Um caso em 2014 | 41 |
| Figura 28 - Mapa da área I com nenhum caso de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. | 42 |
| Figura 29 – Mapa com todos os casos de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, próximos às nove áreas dentro do raio de 500m, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. Casos 2013 e 2014 | 42 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Tipos de criação e metragem das propriedades estudadas em três Distritos Administrativos de Campo Limpo, São Paulo - SP, 2015. | 10 |
| Tabela 2 - Condições em que animais são criados na região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP, 2014. | 28 |
| Tabela 3 - Animais cujos soros foram testados, por meio da técnica de Soroaglutinação Microscópica, na região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP, 2015. | 30 |
| Tabela 4 - Roedores capturados e testados por meio da Polymerase Chain Reaction (PCR) para presença de <i>Leptospira spp.</i> na região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP, 2013 - 2015. | 34 |
| Tabela 5 - Quantidade de água presente no solo coletado no mês de agosto de 2014, em três distritos administrativos da cidade de São Paulo, SP. | 35 |
| Tabela 6 – Condições físico-químicas das amostras de água positivas para presença de DNA de <i>Leptospira spp.</i> no momento da coleta, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP, 2015. | 36 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1 – Questionário voltado para risco de presença de <i>Leptospira</i> spp.:..... | 47 |
| Anexo 2 – Procedimento de captura de roedores. | 49 |
| Anexo 3 - Certificado do CETEA..... | 54 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| AGRADECIMENTOS | iv |
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABELAS | x |
| LISTA DE ANEXOS | xi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 3 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 3.1. Ratazanas (<i>Rattus norvegicus</i>) | 5 |
| 3.2. Rato de telhado (<i>Rattus rattus</i>) | 5 |
| 3.3. Camundongo (<i>Mus musculus</i>) | 5 |
| 3.4. Leptospirose | 5 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 8 |
| 4.1. Seleção das áreas de estudo | 8 |
| 4.2. Coleta para sorodiagnóstico de leptospirose | 15 |
| 4.2.1. Exame laboratorial das amostras clínicas | 15 |
| 4.3. Captura de roedores | 16 |
| 4.3.1. Eutanásia dos roedores capturados | 18 |
| 4.3.2. Extração DNA dos rim dos roedores | 19 |
| 4.4. Matrizes Ambientais | 19 |
| 4.4.1. Detecção de <i>Leptospira</i> spp. no solo | 19 |
| 4.4.2. Detecção de <i>Leptospira</i> spp. em água. | 22 |
| 4.5. Casos de leptospirose humana | 24 |
| 4.6. Procedimento de biossegurança | 24 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 26 |
| 5.1. Animais de criação | 26 |
| 5.2. Questionário voltado para risco de presença de <i>Leptospira</i> spp. | 26 |
| 5.3. Amostras sanguíneas dos animais de criação | 28 |
| 5.4. Roedores | 31 |
| 5.5. Matrizes Ambientais | 34 |
| 5.6. Casos de leptospirose humana | 37 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 44 |

| | |
|------------------|-----------|
| 8. ANEXOS | 47 |
|------------------|-----------|

1. INTRODUÇÃO

As práticas de criação, produção, processamento e distribuição de uma grande diversidade de produtos alimentares que utilizam insumos e serviços de dentro ou ao redor de região urbana são conhecidas como agricultura urbana (MOUGEOT, 2005). Nas áreas periféricas das grandes cidades brasileiras há locais com ocorrência dessa prática; áreas urbanas com diferentes criações animais, que de modo geral ocorrem em locais com falta de infraestrutura e ausência de saneamento adequado, onde a população apresenta baixo socioeconômico, sendo que ocorre no Município de São Paulo, conforme é corriqueiramente constatado pelas equipes de Vigilância Sanitária e Ambiental do Município São Paulo (PMSP, 2015).

Na América Latina a leptospirose humana está associada a populações de baixo poder aquisitivo e seu controle está relacionado com ampliação do saneamento básico, tratamento da água para consumo humano, coleta e disposição do lixo adequadas e melhor infraestrutura dos imóveis. Roedores como *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus* são facilmente encontrados nessas condições, animais com papel fundamental para a cadeia da leptospirose (OLIVEIRA; ARSKY; CALDAS, 2013).

Sabe-se que o manejo ambiental e o uso de rodenticidas são medidas indicadas para o controle de roedores (BRASIL, 2002). Para que o controle seja realmente efetivo, é necessário o conhecimento do nível de infestação do local, tanto antes quanto após o controle químico. Entretanto, é preciso monitorar a ocorrência de casos de leptospirose nas áreas tratadas a fim de avaliar, também, a eficácia do controle. Para tanto, dados epidemiológicos são levantados e analisados pelos serviços de vigilância dos municípios (BRASIL, 2014).

A avaliação da presença de *Leptospira*, bactéria causadora da leptospirose, nos roedores ou no ambiente não é uma prática comum às prefeituras, por demandarem tempo, infraestrutura e cabedal humano. Porém, essas informações são de especial importância a fim de prever novos casos de leptospirose humana.

Os roedores possuem hábitos gregários (BHARTI *et al.*, 2003), o que pode facilitar a transmissão da doença entre os animais de um mesmo grupo. Além da avaliação de *Leptospira* em roedores é importante averiguar a presença da bactéria nas diferentes matrizes ambientais em condições adequadas, como pH neutro ou levemente alcalino, umidade e sem exposição direta a raios solares. O sorovar Pomona, por exemplo, pode permanecer viável por até 180 dias, mas em solo seco a bactéria permanece por 30 minutos. A bactéria morre rapidamente quando exposta ao

pH ácido, radiação solar e temperaturas inferiores a 7°C ou superiores a 37°C (SOTO et al., 2007).

A investigação da presença de bactérias do gênero *Leptospira* também é importante em animais de criação/domésticos, levando em consideração as perdas econômicas quando o animal vem a óbito ou sofre de infecção crônica que causa infertilidade ou abortamento, nascimento de animais fracos ou natimortos (SANTOS, 2014). A leptospirose é considerada, também, uma zoonose de caráter ocupacional, pois atinge principalmente profissionais envolvidos na criação e na manutenção da produção animal. O maior conhecimento sobre a presença dessas bactérias em animais domésticos e de pequenas criações auxilia no melhor conhecimento da epidemiologia e prevenção da leptospirose (OLIVEIRA; ARSKY; CALDAS, 2013). A falta destas informações pode comprometer o trabalho de prevenção. Assim, este trabalho busca levantar essas informações contribuindo com as medidas de manejo e controle de roedores em áreas de risco para a leptospirose humana e animal.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral verificar a presença de *Leptospira* spp. em animais de criação, em roedores e nas matrizes de solo e água, em área urbana, na cidade de São Paulo.

Como objetivos específicos o trabalho foi planejado para:

Estimar a prevalência de animais de criação sororeagentes a *Leptospira* patogênica e seus sorovares

Estimar a prevalência de roedores infectados por *Leptospira* spp.

Avaliar se a espécie de roedor, tamanho, idade e sexo se relacionam com a presença de *Leptospira*.

Estimar a prevalência de solo e água com a presença de *Leptospira* spp.

Avaliar a relação entre matrizes de solo e água contaminados com animais de criação infectados

Determinar a possível relação das áreas com animais de criação sororeagentes a *Leptospira* com casos de leptospirose humana

3. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009), 93,1% da zona urbana brasileira tem o abastecimento de água adequado. No Estado de São Paulo, esse número sobe para 99,3%. A coleta e o tratamento do esgoto sanitário atendem 80% da população urbana brasileira e 91,1% da população paulista. A coleta de lixo doméstico em áreas urbanas é de 98,2%. Esses dados indicam condições de infraestrutura adequadas no Estado.

Em grandes cidades, o rápido e geralmente desordenado crescimento fazem os órgãos públicos enfrentarem problemas com estabelecimento de edificações em locais nem sempre adequados à construção civil, bem como torna ineficiente os sistemas de saneamento, distribuição de água potável, tratamento de esgotos e coleta do lixo para atender a demanda crescente (BRASIL, 1992; BRASIL 2002).

Embora a infraestrutura seja, muitas vezes, adequada na cidade de São Paulo, existem locais na periferia e, especialmente em áreas de invasão, onde essa não é a realidade. Em condições de pouca ou infraestrutura ausente e saneamento básico e coleta de lixo irregulares, favorecem estabelecimento e a proliferação de pragas urbanas (JACOBI, 2006).

Entre as chamadas “pragas” urbanas, os ratos merecem destaque, pois as três espécies exóticas, principais encontradas nas cidades brasileiras, *Rattus norvegicus* (ratazana), *Rattus rattus* (rato de telhado) e *Mus musculus* (camundongo), se adaptam facilmente às diferentes condições ambientais urbanas e apresentam alta taxa reprodutiva (GARCIA, 1998). A presença destes animais representa sérios riscos, pois causam danos econômicos e transmitem doenças a animais e aos humanos (ALVES, 1990).

As ações que visam prevenir o estabelecimento e a proliferação de roedores são chamadas, no seu conjunto, de *procedimentos* anti-ratização. O controle desses animais é feito por meio do manejo do ambiente, com a alteração das condições físicas e químicas propícias ao seu estabelecimento, como impedir o acesso e reduzir as oportunidades de abrigo e oferta de alimentos. (KEINER 2005; PAPINI, 2008).

O controle de roedores visa principalmente a espécie *R. norvegicus*, principal espécie relacionada à transmissão de leptospirose ao homem (GAUDIE et al. 2008; KRØJGAARD et al., 2009). Em 2001, foram analisadas 600 ratas capturadas no sudoeste da Inglaterra, constatando-se a presença de *Leptospira* spp. em 14% dos indivíduos. Na Turquia em Sunbul, estudos com 59 animais capturados na região do Mar Negro a prevalência da bactéria foi de 27,1% nos tecidos renais e 16,9% nos tecidos cerebrais (MONTES, et al., 2002).

3.1. Ratazanas (*Rattus norvegicus*)

A ratazana é um rato de grande porte que pesa entre 150g e 600g e mede até 22cm de comprimento. Possui orelhas pequenas, focinho arredondado, membranas interdigitais e cauda grossa medindo entre 16cm e 25cm. Vive em colônias, uma pequena colônia tem entre dez a 26 indivíduos, sendo que o número de indivíduos depende da disponibilidade de abrigo e água. Abriga-se, em geral, abaixo do solo, cavando tocas, formadas por galerias ou túneis, procriando nestes locais (POTENZA; ZORZENON, 2006). Também é frequente sua circulação por galerias de esgoto e de águas pluviais, caixas subterrâneas de telefone e margens de córregos, pois preferem locais próximos à fonte de alimento e água, sendo favorecida pelo ambiente urbano degradado por ocupações irregulares, sem infraestrutura de saneamento. Tem preferência por alimentos ricos em proteína e gordura (MASI et al., 2009).

3.2. Rato de telhado (*Rattus rattus*)

Rattus rattus (rato de telhado ou rato preto) adulto tem em média 20cm de comprimento, pesa entre 100 e 350g e a cauda é maior que a soma do tamanho da cabeça e do corpo. É um hábil escalador. Tem preferência alimentar por frutas, açúcares e verduras (ALVES, 1990). Alguns autores alegam que essa espécie tem pouca importância na cadeia epidemiológica da leptospirose (ESTEVES, 2005).

3.3. Camundongo (*Mus musculus*)

M. musculus (camundongo) é a menor espécie de roedor entre as três sinantrópicas e é encontrado em quase todo o planeta (BRASIL, 2002). O adulto chega a 9cm de comprimento e pode pesar 25g (MASI, 2009). Habita normalmente interior de gavetas e armários, onde costuma fazer seus ninhos, sendo conhecido como praga intradomiciliar (MEEHAN, 1984). Essa espécie tem pouca importância como reservatório para *Leptospira* spp. (ROSSETTI; VANASCO; PINI, 2004) (CORDEIRO, 1981).

3.4. Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose de grande importância para a saúde pública. Pode ser adquirida pelo contato com reservatórios animais ou ambientes contaminados por sua urina. A bactéria *Leptospira* tem distribuição mundial. É uma bactéria helicoidal (espiroqueta) aeróbica obrigatória, da qual se conhecem atualmente 14 espécies patogênicas, sendo a mais prevalente a *Leptospira interrogans*. A unidade

taxonômica básica é o sorovar (sorotipo). Mais de 200 sorovares já foram identificados, entre eles *Leptospira interrogans* e saprófitas (Leptospiras não patogênicas) (BRASIL, 2013).

Os sorovares possuem hospedeiros específicos, conhecidos como reservatório ou hospedeiro mantenedor; as infecções ocorrem em hospedeiros acidentais, nos quais ocorre a infecção crônica nos túbulos renais, levando-o a albergar a bactéria por longos períodos (HUNDER, 2004). Qualquer sorovar pode determinar as diversas formas de apresentação clínica no homem; no Brasil, os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni frequentemente estão relacionados aos casos humanos mais graves (BRASIL, 2013).

A infecção em humanos é por contato direto com roedores, cães, gado ou por contato indireto com a urina de animais infectados, ou ainda pelo contato com solo e água contaminados (OCHOA, 2000). A maior incidência ocorre em épocas chuvosas, pois a água ajuda na disseminação das bactérias. Os sinais e sintomas da doença não são específicos, o que dificulta o diagnóstico, levando a óbito aproximadamente 10% das pessoas infectadas (SUPUTTAMONGKOL, 2010).

A leptospirose consiste em duas fases, a inicial que pode ser subclínica e a secundária, mais severa e com risco de morte, conhecida como icterícia infecciosa ou Síndrome de Weil, apresentando quadro clínico com icterícia, insuficiência renal, hemorragia, distúrbios graves de volemia e até anemia progressiva (DEMÍNICIS; MARTINS, 2014; GONCALVES *et al.*, 1969). Cerca de 15% das pessoas infectadas progridem para a fase secundária. Os sintomas podem variar tanto em humanos quanto em animais dependendo do sorovar infectante (DEMÍNICIS; MARTINS, 2014). A doença causa ainda danos à economia, pois afeta bovinos e suínos, gerando infertilidade e abortos. O aborto é devido a infecção crônica, chamada de leptospiremia, semanas após a leptospirose (OCHOA, 2000).

Por questões socioculturais, mesmo em grandes cidades, existem criações de animais de pequeno porte e cultivo de vegetais para consumo e venda, inclusive na cidade de São Paulo. Nos locais periféricos da cidade de São Paulo esta prática é relativamente comum e é exatamente nessas áreas onde existe precariedade de infraestrutura urbana, ausência de saneamento ambiental e falta de informações acerca das condições adequadas para a criação de animais e cultivo de vegetais. Sem informações adequadas e em condições ambientais precárias, os animais ficam suscetíveis à contaminação por diferentes patógenos, podendo comprometer a saúde humana. É sabido que a manutenção de animais em condições inadequadas de criação é um fator que favorece a disseminação da leptospirose, especialmente na época das chuvas (MASI *et al.*, 2009).

Pessoas envolvidas no manejo dos animais de criação, em particular aqueles criados em desacordo com os princípios de boas práticas, estão mais sujeitas a contrair determinadas enfermidades, como a leptospirose.

Nos três Distritos Administrativos da Subprefeitura Campo Limpo do Município de São Paulo, em 2012 foram confirmados 14 casos de leptospirose humana, resultando em três óbitos (SINAN NET, 2014). No Brasil são raros os estudos referentes à prevalência de ratazanas infectadas por *Leptospira* em áreas de risco para transmissão de leptospirose e não há dados sobre a presença dessas bactérias nos compartimentos ambientais, água e solo. Tampouco há qualquer estudo desse gênero nos locais com pouca ou nenhuma infraestrutura sanitária e de agropecuária urbana.

Destaca-se que não existe vacina humana eficaz contra a leptospirose, embora haja vacina para animais, mas com baixa eficácia (BHARTI et al 2003; OCHOA, 2000). O diagnóstico humano muitas vezes é tardio, em função dos próprios sintomas da doença que acabam por se assemelhar a outras patogenias mais comuns, o que muitas vezes é o fator responsável pela alta letalidade da doença (SOARES et al., 2010).

Diante da falta de infraestrutura urbana, saneamento básico, presença de roedores associados com hábitos culturais de agricultura urbana, a vacina humana ineficaz e o difícil diagnóstico da leptospirose, salienta-se a importância do levantamento epidemiológico da doença e zoossanitário nas áreas dentro do perímetro urbano da cidade de São Paulo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho contou com apoio laboratorial da Unidade de Doenças Bacterianas da Reprodução, com a Unidade de Bioquímica Fitopatológica e com a Unidade de Ecologia de Agroquímicos do Instituto Biológico, onde foram centralizadas as primeiras ações após a colheita do material. Contou também com o apoio da Unidade de Experimentação do Instituto Biológico onde foram feitas as eutanásias e as necropsias dos roedores após as capturas.

4.1. Seleção das áreas de estudo

Os estudos foram conduzidos em áreas de agricultura urbana nos três Distritos Administrativos (Figura 1), Campo Limpo – 17, Capão Redondo - 19 e Vila Andrade - 85, da Subprefeitura Campo Limpo, Município de São Paulo (23°32.0'S; 46°37.0'W). Região urbana, com aproximadamente 607.105 habitantes em uma área de 36,7 km² (PMSP, 2015).

As áreas foram vistoriadas caracterizando o tipo de criação em cada local e o número de animais presentes (Tabela 1). Em seguida, foi aplicado um questionário junto aos proprietários (Anexo 1) e feitas observações com foco nas condições ambientais que favorecem a presença de *Leptospira* spp.

Os animais presentes nas propriedades (Figuras 2 a 10) foram utilizados para coleta do sangue e obtenção do soro para exame laboratorial visando o sorodiagnóstico para leptospirose.



Figura 1. Mapa do Município de São Paulo com os três Distritos Administrativos da Subprefeitura Campo Limpo em destaque.

Tabela 1 - Tipos de criação e metragem das propriedades estudadas em três Distritos Administrativos de Campo Limpo, São Paulo - SP, 2015.

| Área | Coordenadas geográficas | Metragem | Criação predominante |
|-------------------------|--------------------------------------|--------------------|---|
| A (Figura 2) | 23° 38' 21.84" S 46° 41' 13.43" O | 1600m ² | Anseriformes (gansos) Galináceas |
| B (Figura 3) | 23° 37' 35.48" S 46° 44' 41.16" O | 400m ² | Equinos Bovinos Galináceas |
| C (Figura 4) | 23° 37' 32.61" S 46° 44' 43.62" O | 800m ² | Bovinos Ovinos Equinos |
| D (Figura 5) | 46° 47' 27.67" O 23° 38' 55.89" S | 1500m ² | Equinos |
| E (Figura 6) | 46° 46' 52.53" O 23° 39' 37.38" S | 750m ² | Caprinos Galináceas |
| F (Figura 7) | 23° 39' 24.70" S 46° 46' 53.01" O | 22m ² | Galináceas Anseriformes (ganso, patos, marrecos e perus) |
| G (Figura 8) | 23° 41' 00.12" S 46° 46' 57.30" O | 11m ² | Anseriformes (patos) Galináceas |
| H (Figura 9) | 23° 40' 23.10" S 46° 47' 22.85" O | 1500m ² | Equinos Bovinos Galináceas Anseriformes (Gansos, patos, marrecos e perus) |
| I (Figura 10) | 46° 47' 50.90" O 23° 41' 19.23" S | 17m ² | Galináceas |



Figura 2 – Área de estudo denominada como A, no Distrito Administrativo 17, Campo Limpo, São Paulo, SP.



Figura 3 – Área de estudo denominada como B, no Distrito Administrativo 85, Campo Limpo, São Paulo, SP.



Figura 4 – Área de estudo denominada como C, no Distrito Administrativo 85, Campo Limpo, São Paulo, SP.

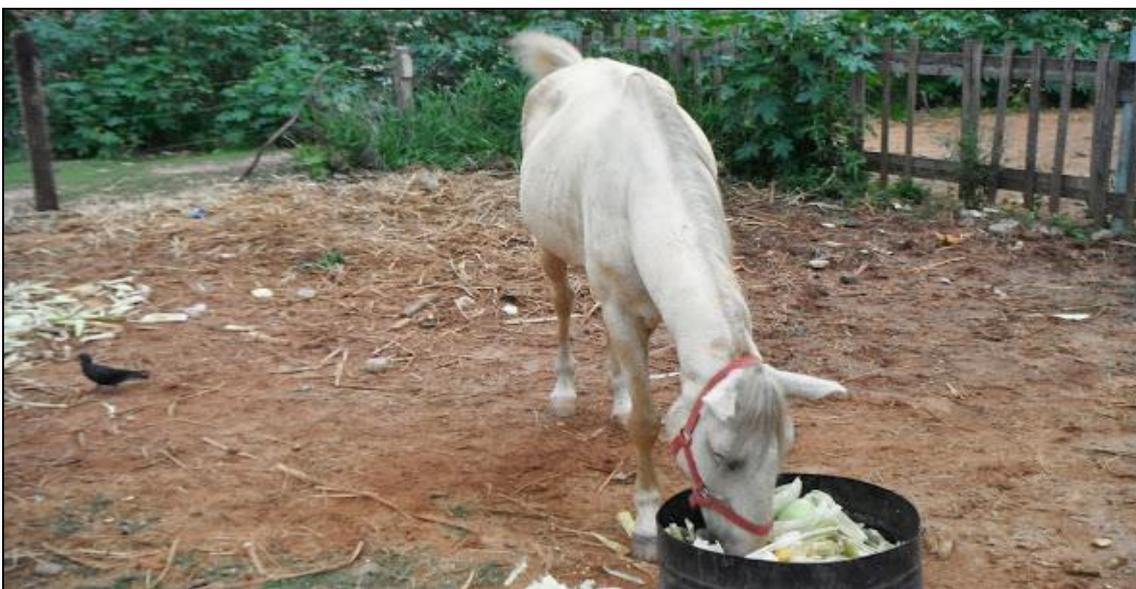


Figura 5 – Área de estudo denominada como D, no Distrito Administrativo 19, Campo Limpo, São Paulo, SP.



Figura 6 – Área de estudo denominada como E, no Distrito Administrativo 19, Campo Limpo, São Paulo, SP.



Figura 7 – Área de estudo denominada como F, no Distrito Administrativo 19, Campo Limpo, São Paulo, SP.



Figura 8 – Área de estudo denominada como G, no Distrito Administrativo 19, Campo Limpo, São Paulo, SP.



Figura 9 – Área de estudo denominada como H, no Distrito Administrativo 19, Campo Limpo, São Paulo, SP.



Figura 10 – Área de estudo denominada como I, no Distrito Administrativo 19, Campo Limpo, São Paulo, SP.

4.2. Coleta para sorodiagnóstico de leptospirose

Cerca de 2mL de sangue foram colhidos de forma asséptica com seringa de 3mL e agulhas com calibre 0,8mm x 25mm, 0,55mm x 20mm e 13mm x 4,5mm, de acordo com a espécie animal. O sangue coletado foi colocado em tubos a vácuo seco. Após aproximadamente uma hora em repouso, à temperatura ambiente, o soro foi separado e transferido para tubos de centrifuga de 2mL que foram armazenados à -20°C até o momento do processamento. As coletas de sangue foram acompanhadas pela médica veterinária, Juliane Cristina Barbosa de Aguiar Ferreira, CRMV- SP 11825.

4.2.1. Exame laboratorial das amostras clínicas

O exame, sorodiagnóstico para leptospirose foi realizado no Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico, São Paulo. Foi utilizada a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos, empregada para mensuração dos níveis de aglutininas para todas as amostras de soros. Foram utilizadas 24 culturas vivas de sorovares de *Leptospira* spp. mantidas em meio líquido de EMJH modificado (ALVES, 1995), com sete a dez dias de crescimento, livres de

contaminação e de autoaglutinação. A reação foi efetuada em microplacas de poliestireno com 96 poços, utilizando-se volume de 50µL de soro diluído inicialmente a 01h50min em solução salina tamponada de Sorënsen (pH 7,4) e adicionando-se 50µL de antígeno, obtendo-se diluição inicial 1:100. Para determinação do título final de aglutininas antileptospiras em cada soro, foram efetuadas diluições seriadas em progressão geométrica de razão dois em solução salina tamponada de Sorënsen (pH 7,4). As microplacas foram incubadas em estufa a 28-30°C por três horas; seguindo-se a leitura em microscopia de campo escuro seco, no aumento de 100 vezes, observando-se a formação de aglutinações. O título do soro foi considerado como a recíproca da maior diluição que apresentou 50% de leptospiras aglutinadas, o título considerado reagente a partir de 1:100 (FAINE et al., 1999). Os antígenos vivos incluíram os sorovares Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Grippotyphosa, Wolffi, Hardjo, Andamana, Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Butembo, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Hebdomadis, Javanica, Panama, Patoc, Pyrogenes, Shermani, Tarassovi, Whitcombi e Sentot.

4.3. Captura de roedores

Os roedores foram capturados com armadilhas tipo Tomahawk® (Figura 11) (30cm x 19cm x 19cm) colocadas nas áreas de estudo. O esforço de captura foi de 10 armadilhas/noite/área, as quais foram colocadas nas áreas três dias antes do início da captura com o gatilho de acionamento. Como isca foram usados pedaços de bacon e mortadela, para que os roedores pudessem se acostumar a elas e com isso evitar interferência do comportamento inato de neofobia nas capturas. As capturas foram realizadas, então, por quatro dias não consecutivos, compreendendo o esforço total de captura de 40 armadilhas/noite/área. As armadilhas foram instaladas no meio da tarde, por volta das 15 horas, e verificadas no dia seguinte pela manhã, por volta das 9 horas.



Figura 11 - *Rattus norvegicus* capturado em armadilha tipo Tomahawk®.

Após a captura os roedores foram colocados em uma armadilha limpa, sendo aplicado o inseticida organofosforado diclorvós (DDVP) diluído em água (seguidas as instruções fornecidas pelo fabricante) para eliminação de possíveis ectoparasitas, pulgas, carrapatos e ácaros. As armadilhas foram acondicionadas em caixas plásticas (Figura 12) cobertas com tule e transportadas em caminhonete com caçamba aberta até a Unidade de Experimentação – IB. Em todos os procedimentos foram adotadas medidas de biossegurança, de acordo com o Procedimento para Captura de Roedores (Anexo 2).



Figura 12 – Rato acondicionado em caixa plástica para transporte.

Antes do início do desenvolvimento do estudo, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa com Animais do Instituto Biológico – CETEA IB para avaliação das condições manutenção e manipulação dos animais, obtendo aprovação sob o número CETEA/IB 123/12 (Anexo 3).

4.3.1. Eutanásia dos roedores capturados

A eutanásia foi realizada na câmara de CO₂, na qual a armadilha com o roedor foi colocada no seu interior, exposto a um fluxo de 7L/min durante cinco a dez minutos, até o animal não apresentar sinais vitais. Após a eutanásia foram coletadas as medidas biométricas e feita a identificação do sexo dos roedores.

Na necropsia foi aberta a caixa torácica, seccionada a artéria pulmonar, sendo o sangue extravasado coletado com seringas descartáveis de 3mL transferido para tubos de ensaio de 10mL e deixado em repouso, à temperatura ambiente para separação do soro. Logo após, o soro foi separado em micro tubo de plástico 2mL, armazenado a -20°, para posterior análise sorológica (BEVILAQUA et al., 2004). Foi aberto o abdome do roedor e removidos os rins, que localizam-se um de cada lado da coluna vertebral na região lombar. Para remoção foi utilizado pinça e tesoura. Os órgãos foram armazenados em micro tubo de plástico 2mL à -20°C, para posterior análise molecular na Unidade de Bioquímica Fitopatológica – IB.

4.3.2. Extração DNA dos rim dos roedores

Para extração total dos rins dos roedores foi utilizado o kit de extração comercial RealiaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega, Madison-WI). Foi utilizado uma amostra de 25mg do tecido renal, macerada com almofariz e pilão. Adicionado 160µL de PBS a cada amostra e agitado por 5 segundos e acrescentado 20µL de Proteinase K (PK), adicionado 200µL de Lise Celular (CLD), vortexado por 10 segundos e incubado a 56°C durante 30 minutos em termobloco com *shaker*, para digestão.

Após o período de digestão foi adicionado 20µL da RNase A, misturado em vortex por 10 segundos e colocado em termobloco com *shaker* a 56°C durante 10 minutos. Foi retirado do termobloco e adicionado 250µL de tampão de ligação (*Binding Buffer* - BBA) agitado durante 10 segundos. Colocado em uma coluna de purificação Binding ReliaPrep™, transferido centrifugado por 1 minuto a 14000rpm. Foi descartado o sobrenadante, adicionado na coluna 500µL de solução de lavagem (CWD) centrifugado por 2 minutos a 14000rpm. O procedimento foi realizado por mais duas vezes no total de três lavagens. A coluna foi colocada em um tubo novo de 1,5mL e adicionado 200µL de Água *Nuclease-Free*. Centrifugado por 1 minuto a 14000rpm. Foi descartado a coluna, e DNA sobrenadante foi acondicionado a -20°C para posterior utilização.

Condições da PCR

Os *primers* (LipL32-270F (5'-CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT-3') e LipL32-692R (5'-CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT-3')) amplificaram um produto de 423 pb do gene codificador da lipoproteína LipL32. (LEVETT, 2005)

Para a amplificação foram feitas nas seguintes condições: em uma reação total de 25µL, foi adicionado 5µL de Buffer (concentração a 0,50Mm), 0,50µL de de dNTPs a 10mM, 2,00µL de cada *primer* (concentração a 10Mm) e 0,2µL da enzima Green GoTaq™ (Promega, Madison, WI) e completado com 13,8 µL H₂O MiliQ estéril e 1,5µL de DNA.

4.4. Matrizes Ambientais

4.4.1. Detecção de *Leptospira* spp. no solo

As coletas de solo foram realizadas entre 8 e 25 de agosto de 2014 em dias ensolarados e nublados, época de longa estiagem do ano. As amostras foram

coletadas às margens de córrego, lago, ou qualquer fonte de água presente na propriedade, quando presente, e em locais sombreados onde ocorre o pastoreio e descanso dos animais.

Em cada área selecionada foram coletadas, com trado (Figura 133), cinco amostras de solo no período da manhã na profundidade de 10cm, colocadas em sacos plásticos, identificados (Figura 14). A quantidade de água presente no solo foi determinada imediatamente logo após a coleta a partir de amostras com 3g de meio, em analisador infravermelho de umidade (METTLER LJ16) por 20 minutos à 120°C no Laboratório de Ecologia de Agroquímicos – LEA IB.



Figura 13 – Trado.



Figura 14 – Coleta de solo com trado.

No Laboratório de Bioquímica Fitopatológica. IB, foi feita a extração de DNA encontrado nas amostras de solo com o kit PowerSoil® DNA Isolation. Foi colocado 0.25g de do meio coletado em tubos PowerBead e agitado delicadamente para ocorrer a mistura do material. Foram adicionados 60 μ L de solução C1, que foi agitada por 10min, centrifugada por 30s a 14000rpm e transferido 500 μ L do sobrenadante para um tubo coletor 2mL. Foram adicionados 250 μ L da solução C2, agitada por 5s e incubada por 5min a 4°C. Foram adicionados 200 μ L da solução C3, agitada brevemente, incubada por 5min a 4°C, centrifugada por 1min a 14000rpm e transferidos 750 μ L do sobrenadante para um novo tubo coletor 2mL. Foi agitada a solução C4, adicionada ao sobrenadante e agitada por 5s, em seguida colocados 675 μ L do sobrenadante no filtro, centrifugado a 14000rpm por 1min e descartado o filtrado. O procedimento foi repetido mais duas vezes em um total de três cargas para cada amostra. Foram adicionados 500 μ l da solução C5, centrifugada por 30s a 14000rpm e descartada o fluido filtrado. A seguir foi centrifugada por 3min a 14000rpm. Foi colocado o filtro em

um novo micro tubo de plástico 2mL, adicionada a solução C6 e centrifugada a 14000rpm por 30s, o filtro foi descartado. O DNA foi acondicionado a -20°C para posterior utilização.

Para a amplificação do extraído do solo foram utilizados os mesmo *primers* utilizados para amplificação do extraído dos rins nas seguintes condições: em uma reação total de 25µL, foi adicionado 5µL de Buffer (concentração a 0,50Mm) , 0,50µL de de dNTPs a 10mM, 2µL de cada *primer* (concentração a 10Mm) e 0,1µL da enzima Green GoTaq™ (Promega, Madison, WI) e completado com 14,4 µL H₂O MiliQ estéril e 1µL de DNA.

4.4.2. Detecção de *Leptospira* spp. em água.

As coletas de água foram feitas em janeiro de 2015, e as amostras foram obtidas de córregos, nascentes, poças, lagos e bebedouros que os animais tinham acesso por contato direto para dessedentação (Figura 15). As amostras foram coletadas com uma “concha adaptada” (Figura 16) e colocadas em potes de vidro de 500mL. Ainda em campo foram medidos pH e temperatura. Após a coleta as amostras foram refrigeradas até ser feita a extração de DNA total.



Figura 15 – Água empoçada usada para dessedentação de animais de criação.



Figura 16 - Concha adaptada para coleta de água de dessedentação de animais.

No Laboratório de Bioquímica Fitopatológica. IB, foi feita a extração de DNA nas amostras de água com o kit PowerWater® DNA Isolation. Foram filtrados 100mL ou o que fosse filtrado em 10min de acordo com a turvação da água, usando um filtro, contendo membrana de 0,22 ou 0,45 μm acoplado a um Kitassato acoplado em uma bomba de vácuo (Tecnal, TE – 058). A membrana do filtro foi retirada com duas pinças estéreis e inserida no tubo 5mL PowerWater® Bead. Foi adicionado 1mL de solução PW1 reagente que quebra as paredes celulares, inclui um detergente para ajudar a remover material orgânico e inorgânico (aquecida a 55°C e usada ainda quente) ao Tubo PowerWater® Bead, e agitado por 5 minutos à velocidade máxima. Foi deixado em repouso por 15 minutos, transferido o sobrenadante para um tubo limpo 2mL Collection e centrifugado por 1 minuto a 14000rpm, novamente foi transferido o sobrenadante para um tubo limpo 2mL Collection. Foram adicionadas 200 μL de solução PW2 para remover matéria orgânica e inorgânica que não é DNA e brevemente agitada e incubada a 4°C durante 5 minutos, após foi centrifugada por 1 minuto a 14000rpm e o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo 2 mL Collection. Foi adicionado 650 μL de solução PW3 solução de alta concentração de sal que deve ser aquecida à 55°C para diluição do precipitado e agitado. Foram transferidos 650 μL de sobrenadante para um filtro de sílica e centrifugado por 1 minuto a 14000rpm, O filtrado foi descartado. O procedimento repetido até que todo o sobrenadante tenha sido filtrado sobre rotação. O filtro somente foi centrifugado por 2 minutos a 14000rpm. Foram adicionados 650 μL da solução PW4 (solução de lavagem à base de álcool) agitada e centrifugada por 1 minuto a 14000rpm, logo após foi descartado o filtrado e adicionados 650 μL da solução PW5 (solução de lavagem) e centrifugada por 1 minuto a 14000rpm, o filtrado foi descartado e centrifugado por 2 minutos a 14000rpm para remover o resíduo da lavagem. Foi colocado o filtro de sílica em um tubo coletor 2 mL limpo e adicionado 100 μL da solução PW6 (tampão de eluição estéril) e centrifugada por 1 minuto a 14000rpm. O filtro foi descartado e o DNA foi acondicionado a -20°C para posterior utilização.

Para a amplificação do extraído da água foram utilizados mesmos *primers* utilizado na amplificação do extraído dos rins nas seguintes condições: em uma reação total de 25µL, foi adicionado 5µL de Buffer (concentração a 0,50Mm), 0,50µL de de dNTPs a 10mM, 1,00µL de cada *primer* (concentração a 10Mm) e 0,2µL da enzima Green GoTaq™ (Promega, Madison, WI) e completado com 15,8 µL H₂O MiliQ estéril e 1,5µL de DNA.

A amplificação do extraído dos rins, do solo e da água foram feitas em Termociclador T100™ Thermal Cycler (BioRad, Hercules – CA) condições de ciclagem foram conforme descritas abaixo:

| | |
|---|-------|
| 94°C – 2 minutos – desnaturação inicial | |
| 94°C – 15 segundos - desnaturação | } 40X |
| 60°C – 30 segundos - anelamento | |
| 72°C – 30 segundos - extensões | |
| 72°C – 4 minutos – extensão final | |
| 12°C – por tempo indeterminado | |

Essa amplificação gerou um fragmento de 423pb que foram confirmados por gel de agarose 0,8%.

4.5. Casos de leptospirose humana

Foi feito o levantamento junto ao banco do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do número e localização dos casos de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015 para verificar se houve ocorrência de casos nas áreas estudadas. O levantamento foi realizado em um raio de 500 metros a partir de cada uma das áreas estudadas. Os casos de leptospirose humana encontrados neste raio foram marcados em mapas do Google Earth para facilitar a análise dos dados.

4.6. Procedimento de biossegurança

Armadilhas usadas para captura e outros materiais reutilizáveis que tiveram contato com os roedores capturados foram autoclavados, lavados e secos para reutilização.

Todo o material usado na Unidade Experimental – IB foi autoclavado antes do descarte, incluindo os cadáveres dos animais.

O material usado na coleta do sangue dos animais foi descartado em caixa coletora para perfuro cortantes e encaminhados pela SUVIS Campo Limpo à Unidade Básica de Saúde Vila Prel, para destinação final adequada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Animais de criação

Duzentos e dez animais de criação foram registrados nas nove áreas de criação zootécnicas, a variação foi de 23 animais por área (a quantidade de animais variou entre 13 na área D e 40 animais na área H), 12 equídeos, 13 bovídeos, dez caprídeos, cinco ovídeos, 143 galináceas e 27 anseriformes.

5.2. Questionário voltado para risco de presença de *Leptospira* spp.

Com base no questionário aplicado ao produtor e nas observações feitas durante a vistoria foi possível afirmar que todas as áreas são de criação extensiva, com pouca ou ausente infraestrutura. As propriedades identificadas como C, G, I e H tem baia para os mamíferos e/ou viveiros para as aves. Somente as áreas A e H têm sala para ração. Todas as áreas têm mangueira para lavagem e energia elétrica, somente as áreas B e C não têm água encanada (Figura 17).

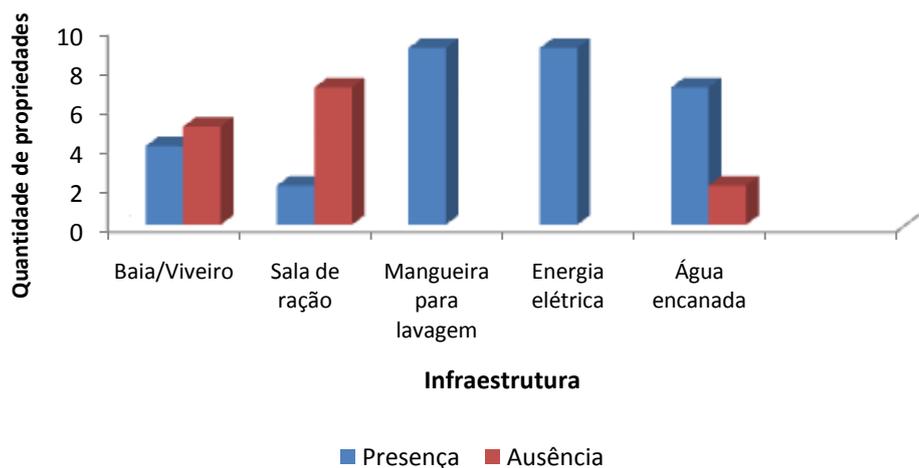


Figura 17 – Resultados obtidos pelo questionário aplicado aos proprietários das áreas estudadas quanto à infraestrutura das propriedades.

A exploração econômica das áreas estudadas é a criação, venda de animais e venda de produtos de origem animal, em pequenas escalas que acontecem nas redondezas. Em três áreas (E, F e H) a exploração econômica é a atividade principal exercida nas propriedades. Em outras quatro áreas (A, B, C e G) essas atividades são complementares para renda familiar, e nas demais (D e I) as atividades são consideradas hobby (Tabela 2).

Em todas as áreas os animais têm acesso a vegetação de má qualidade (ervas daninhas, capim sem controle de qualidade) que servem de alimentação, sendo o uso de ração feito para complementar a dieta. Nas áreas D e H é feito o uso de suplementação com vitaminas. Nas áreas B, D, E, F, I a única fonte de água são bebedouros. Na área A além dos bebedouros há um lago e duas nascentes. Nas áreas C, G e H os animais têm acesso ao córrego, onde desemboca o esgoto das casas vizinhas (Tabela 2). O manejo reprodutivo utilizado na produção animal é feito de forma natural.

Tabela 2 - Condições em que animais são criados na região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP, 2014.

| Identificação da área | Vegetação de má qualidade | Suplementação e uso de vitaminas | Bebedouros como fonte de água | Lago e nascentes no local | Acesso ao córrego |
|-----------------------|---------------------------|----------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------|
| A | + | - | + | + | - |
| B | + | - | + | - | - |
| C | + | - | + | - | + |
| D | + | + | + | - | - |
| E | + | - | + | - | - |
| F | + | - | + | - | - |
| G | + | - | + | - | + |
| H | + | + | + | - | + |
| I | + | - | + | - | - |

+ Presença / - Ausência

Somente os animais da área D são vermifugados. Nenhuma das áreas faz controle de helmintos, exames periódicos e uso de algum tipo vacinas nos animais. Também não deixam os animais oriundos de outras localidades em quarentena. A higiene e assepsia das instalações não são feitas. Em nenhuma das áreas há isolamento de animais doentes. Em todas as áreas foram encontrados lixo e inservíveis e ausência de controle de roedores nos locais, seja desratização, seja anti-ratização, sendo que em todas as áreas há presença de roedores, bueiros próximos, bem como estrutura das propriedades que favorece a procriação de roedores no local.

Destaca-se que os animais das áreas B, C, D e H têm acesso a vias públicas.

5.3. Amostras sanguíneas dos animais de criação

Foram coletados no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, 70 soros sanguíneos de diferentes espécies animais, o que correspondeu a 33,3% do total de animais presentes nas áreas amostradas. São eles: equídeos 10/70, bovídeos 9/70, caprídeos 7/70, ovídeos 4/70, galináceas 28/59 e anseriformes 12/59 (Tabela 3).

Destes 70 soros, 48,6% (34/70) apresentaram soropositividade para leptospirose. Somente em uma área (E) não houve animais sororeagentes para leptospirose.

O sorovar encontrado com maior frequência foi Icterohaemorrhagiae em 52,9% (18/34) seguido de Butembo 20,6% (7/34), Pomona 11,8% (4/34), Copenhageni 5,9% (2/34), Castellonis 2,9% (1/34).

Tabela 3 - Animais cujos soros foram testados, por meio da técnica de Soroaglutinação Microscópica, na região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP, 2015.

| Área | Quantidade de animais | Coletados | Positivos | Sorovar / Titulação |
|------|-----------------------|-----------|-----------|---|
| A | 4 anseriformes | 1 | - | - |
| | 10 galináceas | 3 | 3 | 3 Icterohaemorrhagie(100) |
| B | 1 equino | 1 | 1 | 1 Icterohaemorrhagiae(400)+Castellonis(200)+Butembo(100) |
| | 4 bovinos | 1 | - | - |
| | 18 galináceas | 4 | 3 | 1 Butembo(100) 2 Icterohaemorrhagie (100) |
| C | 7 Bovinos | 6 | 5 | 1 Wolffi (100)+Hardjo(100) 1 Pomona(400) 1 Pomona(400)+Pyrogenes(100) 1 Icterohaemorrhagie(200) 1 Icterohaemorrhagie (100) |
| | 5 ovinos | 4 | 2 | 1 Icterohaemorrhagie(100)+Pomona(100) 1 Castellonis(200) |
| | 2 equinos | - | - | - |
| D | 4 equinos | 4 | 3 | 1 Icterohaemorrhagie(200)+Copenhageni(100) 1 Butembo(200) 1 Icterohaemorrhagie(100) |
| | 7 galináceas | - | - | - |
| E | 10 caprinos | 7 | - | - |
| | 20 galináceas | 4 | - | - |
| F | 20 galináceas | 4 | 2 | 1 Icterohaemorrhagie(100)+Butembo(200) 1 Butembo(100) |
| | 6 anseriformes | 5 | 1 | 1 Butembo (100) |
| G | 2 anseriformes | 2 | 2 | 1 Copenhageni(100) 1 Butembo(400) |
| | 12 galináceas | 5 | 2 | 1 Icterohaemorrhagie(100) 1 Butembo(100) |
| H | 5 equinos | 5 | 5 | 1 Icterohaemorrhagie(200) + Pomona(100) + Australis(100) + Autumnalias(200) + Butembo(200) + Castellonis(200) 1 Icterohaemorrhagie(400) + Pomona(100) + Copenhageni(100) + Butembo(100) + Castellonis(100) 1 Icterohaemorrhagie(400) + Copenhageni(200) + Butembo(100) + Castellonis(100) 1 Icterohaemorrhagie(800) + Pomona(100) + Copenhageni(200) + Autumnalis(200) + Butembo(400) + Castellonis(100) 1 Icterohaemorrhagie(400) + Conheageni(200) + Castellonis(100) |
| | 2 bovinos | 2 | 2 | 1 Icterohaemorrhagie(100) + Hardjo(100)+Castellonis(100) 1 Icterohaemorrhagie(1600) + Copenhageni(1600)+Castellonis(100) |
| | 18 galináceas | 2 | 1 | 1 Icterohaemorrhagie(100) |
| | 15 anseriformes | 4 | 1 | 1 Icterohaemorrhagie(200)+Capenhageni(100) |
| I | 38 galináceas | 6 | 1 | 1 Icterohaemorrhagie(400)+Copenhageni(100) |

A alta porcentagem de animais soropositivos para leptospirose (48,6%) encontrados na região de Campo Limpo, periferia de São Paulo, sendo que somente uma área continha animais livres da bactéria, sinaliza uma problemática para os produtores. É uma importante questão econômica para esses produtores, pois os animais estão sujeitos a abortamento e/ou infertilidade de acordo com o sorovar. O sorovar Hardjo, por exemplo, pode acometer bovinos, uma vez que é responsável por nascimentos de animais fracos e natimortos (DHALIWAL *et al.*, 1996).

Os sorovares de maior importância para saúde pública são Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, pois estão relacionados aos casos mais graves de leptospirose humana (BRASIL, 2013). Icterohaemorrhagiae foi encontrado em 52,9% dos animais analisados e Copenhageni em 5,9%. Os animais portadores podem contribuir para a disseminação das bactérias no meio ambiente e o contato do homem com animais infectados é de grande importância para transmissão (HIGGINS *et al.*, 1980). Devido a casos de infecção humana ao lidar com os animais, a leptospirose é considerada uma doença ocupacional (BRASIL, 1995). O sorovar Icterohaemorrhagiae é de risco para a saúde pública, uma vez que é um dos causadores mais comuns de leptospirose humana (BRASIL, 2002).

Apesar de serem pouco estudadas, as aves podem ter importância para o ciclo da leptospirose (GUBLER, 2001). Dos anseriformes avaliados 33,3% (4/12) foram positivos para leptospirose. Destes animais positivos, dois foram reagentes para o sorovar Butembo, um para o sorovar Copenhageni e um para o sorovar Icterohaemorrhagiae. Das galináceas avaliadas 42,8% (12/28) foram positivas para leptospirose. Destes animais positivos oito (66,7%) foram reagentes para o sorovar Icterohaemorrhagiae e quatro (33,3%) para Butembo. Em um estudo de Caffarena *et al.* (1989) 35% das galinhas reagiram para o sorovar Butembo, dados semelhantes ao encontrado neste estudo.

5.4. Roedores

O esforço de captura foi de 360 armadilhas no período estudado. Foram capturados 35 roedores (*R. rattus* e *R. norvegicus*), com um sucesso de captura de 9,7% dos animais capturados. O sucesso de captura esperado para roedores é em média entre 10% a 20% (BRASIL, 2002). Diante disso, as capturas do presente trabalho não foram eficientes, já que o valor obtido foi 9,72%, média menor que o esperado. O sucesso de captura pode ter sofrido interferência dos animais de criação, que algumas vezes desarmaram as armadilhas, por curiosidade, no caso das aves para pegar as iscas.

Foram capturados cinco exemplares de *R. rattus* e 30 *R. norvegicus* nas nove áreas. Os rins de todos esses animais foram removidos, tendo sido realizada a sorologia de dois *R. rattus* (capturados na área D) e dois *R. norvegicus* (capturados na área A e B). Na área I, por conta do fim da criação dos animais, não foram capturados nenhum roedor.

Os exemplares de *R. rattus* foram soronegativos para leptospirose. Em teste que Esteves (2005) realizou em 27 *R. rattus* somente um apresentou positividade (sorovar Icterohaemorrhagiae), mostrando que apesar do *R. rattus* ser potencial reservatório para *Leptospira* spp. tem pouca importância para a cadeia da leptospirose.

Os exemplares de *R. norvegicus* foram soropositivos para o sorovar Copenhageni com titulação 100 e o outro soropositivo para o sorovar Pomona com titulação 400 (Tabela 4). As amostras de soro do *R. norvegicus* positivas confirmam a afirmação de Almeida-Silva (2008) que *R. norvegicus* são reservatórios mais frequentes para *Leptospira* spp.

Todos *R. norvegicus* foram positivos na técnica de PCR (Figura 18) e dentre os cinco *R. rattus* apenas dois foram positivos (Tabela 4). Do restante dos roedores não foi feita a sorologia por quantidade de soro insuficiente.

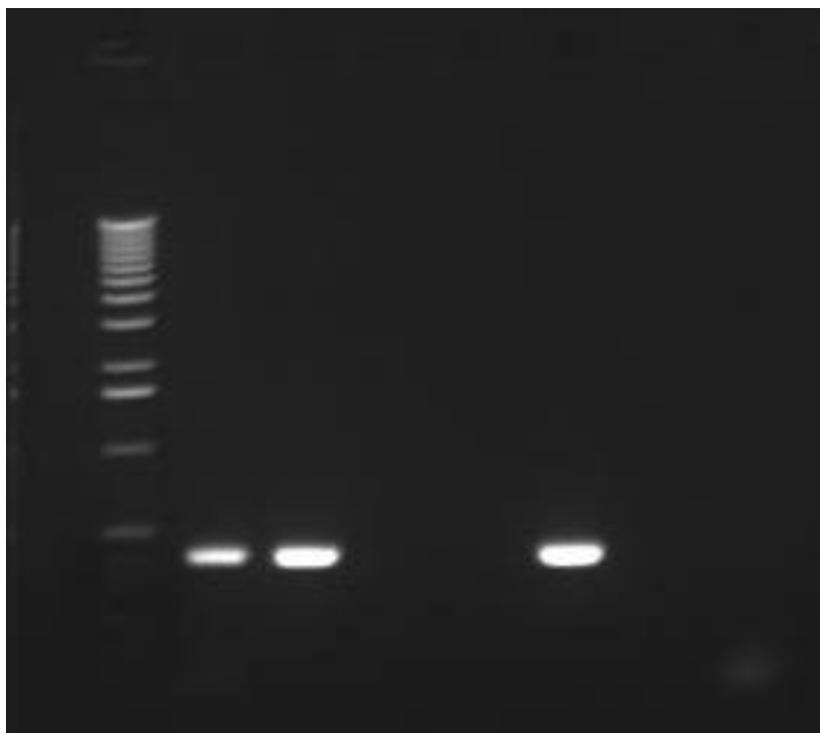


Figura 18 – Duas amostras de DNA de rins de roedores e o controle positivo, amplificação que gerou um fragmento de 423pb que foram confirmados por gel de agarose 0,8%.

Dos 30 *R. norvegicus* capturados, 18 eram machos e 12 fêmeas sendo que, dentre os machos quatro não haviam atingido a maturidade sexual e o mesmo número de fêmeas, também não. Dentre os cinco *R. rattus* capturados foram identificados três fêmeas e dois machos, sendo que, dentre as fêmeas duas já tinham atingido a maturidade sexual e uma ainda não; todos os machos já haviam atingido a maturidade sexual.

Dos roedores capturados neste trabalho a maior quantidade (53,57%) foi de machos adultos, com potencial para ser o indivíduo dominante. Por viver em grupos, onde existe hierarquia, um ou mais indivíduos tanto do sexo masculino como do feminino podem ser dominantes (MASI, 2009). Ratos dominantes são mais propensos a consumir alimento direto da fonte (WHISHAW & WHISHAW, 1996), o que os torna mais suscetíveis a entrar em armadilhas (DAVIS & CRISTIAN, 1958).

Os animais capturados tiveram tamanhos condizentes com os registros de literatura. Em média o peso dos *R. rattus* capturados foi 125,5g e de 287,8g para *R. norvegicus*, de forma que, independente do tamanho, ou se adultos ou jovens, *R. norvegicus* é uma espécie de roedor que transmite a leptospirose igualmente.

Tabela 4 - Roedores capturados e testados por meio da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para presença de *Leptospira* spp. na região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP, 2013 - 2015.

| Área | Espécie capturada | Sexo | Positivo na PCR | Coletado soro para técnica de Sam | Positivo na técnica de SAM |
|------|----------------------------|----------|-----------------|-----------------------------------|----------------------------|
| A | 1 <i>Rattus rattus</i> | Fêmea | - | - | Copenhageni (100) |
| | 5 <i>Rattus norvegicus</i> | 3 Machos | 3 | 1 | |
| | | 2 Fêmeas | 2 | - | |
| B | 1 <i>Rattus rattus</i> | 1 Fêmea | - | - | Pomona (400) |
| | 3 <i>Rattus norvegicus</i> | 1 Macho | 1 | - | |
| | | 2 Fêmeas | 2 | 1 | |
| C | 4 <i>Rattus norvegicus</i> | 4 Machos | 4 | - | |
| D | 3 <i>Rattus rattus</i> | 2 Machos | 1 | 1 | - |
| | | 1 Fêmea | - | 1 | - |
| | 2 <i>Rattus norvegicus</i> | 1 Macho | 1 | - | |
| | | 1 Fêmea | 1 | - | |
| E | 3 <i>Rattus norvegicus</i> | 2 Machos | 2 | - | |
| | | 1 Fêmea | 1 | - | |
| F | 5 <i>Rattus norvegicus</i> | 4 Machos | 4 | - | |
| | | 1 Fêmea | 1 | - | |
| G | 4 <i>Rattus norvegicus</i> | 2 Machos | 2 | - | |
| | | 2 Fêmeas | 2 | - | |
| H | 4 <i>Rattus norvegicus</i> | 1 Macho | 1 | - | |
| | | 3 Fêmeas | 3 | - | |
| I | - | - | | | |

5.5. Matrizes Ambientais

5.5. 1. Solo

O teor médio de umidade das amostras de solo de cada área estudada variou de 20,34% a 41,68% (Tabela 5).

Tabela 5 - Quantidade de água presente no solo coletado no mês de agosto de 2014, em três distritos administrativos da cidade de São Paulo, SP.

| Identificação/Área | Volume médio de solo (g) | Porcentagem média (%) |
|--------------------|--------------------------|-----------------------|
| A | 3,00 | 31,66 |
| B | 3,00 | 26,05 |
| C | 3,00 | 41,68 |
| D | 3,00 | 27,04 |
| E | 3,00 | 27,14 |
| F | 3,00 | 20,34 |
| G | 3,00 | 22,34 |
| H | 3,00 | 37,54 |
| I | 3,00 | 25,12 |

Foram positivas pela técnica de PCR 4,44% das amostras de solo (2/45), uma amostra coletada na área G com o teor de umidade 25,41% e uma amostra da área H com o teor de umidade de 21,09%. Nas duas áreas foram obtidos animais de criação sororeagentes para leptospirose e encontrados roedores positivos para *Leptospira* spp.

O teor de umidade do solo é um fator determinante para presença de leptospiros viáveis. É mais frequente encontrar leptospiros em locais onde a umidade é igual ou superior a 65% (HENRY & JOHNSON, 1978). A presença da bactéria está altamente relacionada com a umidade, tendo maior número de casos de leptospirose humana em épocas chuvosas, mesmo que as chuvas sejam no outono como litoral atlântico nordestino, época com maior ocorrência de casos de leptospirose humana (PAULA, 2005). As amostras de solo coletadas neste trabalho foram feitas no período de seca e em locais com solo úmido, mas, no entanto, em nenhuma amostra o teor de umidade foi igual ou superior a 65%. O fato de ter sido encontrada a bactéria em duas amostras está ligada à técnica utilizada, PCR, que detectou o DNA, independente de estarem vivas ou mortas. Desta forma, mesmo com o substrato seco, as bactérias foram detectadas por ter havido contaminação em período anterior.

As duas áreas em que a bactéria foi detectada por PCR houve animais sororeagentes. No entanto, as matrizes avaliadas das demais áreas, mesmo sem a detecção das bactérias, também apresentaram animais sororeagentes. Infere-se, desta maneira, que a avaliação de matrizes proposta neste trabalho, nem sempre é confiável para a detecção de bactérias. Em um primeiro momento, a técnica de PCR detecta a presença da bactéria em áreas secas, porém, pelo fato das análises serem

realizadas em amostras pequenas, no caso deste estudo 3,0 g de solo, não é possível afirmar que amostras negativas para a bactéria espelhem a contaminação da área.

5.5. 2. Água

Foram positivas pela técnica de PCR 13,33% das amostras de água (6/45) em quatro áreas (A, D, E e G). As áreas A e G foram positivas em duas amostras e as áreas D e E foram apenas em uma (Figura 19). As amostras positivas foram coletadas em nascente, lago, córrego, bebedouros, calha e água empoçada. O pH das amostras positivas variou entre 6,8 a 8,0 e a temperatura foi entre 20°C a 24°C (Tabela 6).

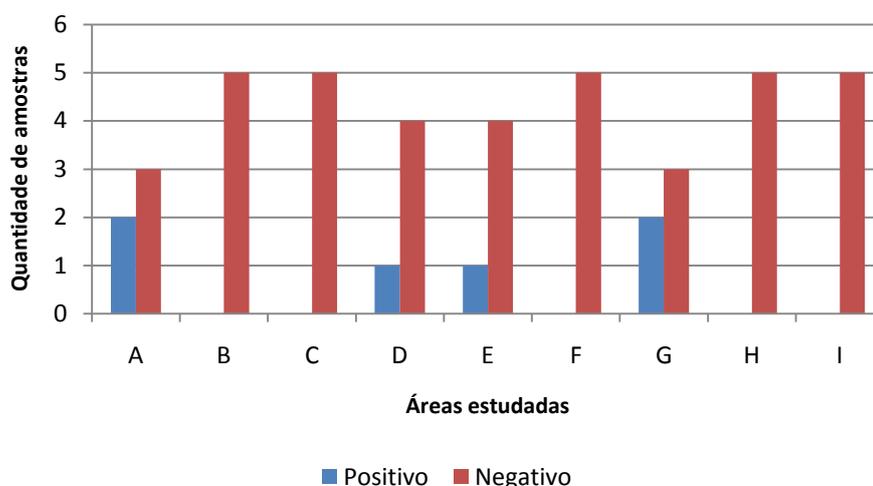


Figura 19 – Presença e ausência de *Leptospira* spp. em amostras de água das áreas de estudo na região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP, 2015.

Tabela 6 – Condições físico-químicas das amostras de água positivas para presença de DNA de *Leptospira* spp. no momento da coleta, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP, 2015.

| Área | Amostras positivas | Local coletado | pH | Temperatura |
|------|--------------------|-----------------|-----|-------------|
| A | 2 | 1 Nascente | 6,8 | 22°C |
| | | 1 Lago | 6,8 | 21°C |
| D | 1 | 1 Córrego | 6,6 | 24°C |
| E | 1 | 1 Bebedouro | 7,8 | 20°C |
| G | 2 | 1 Calha | 8,0 | 22°C |
| | | 1 Água empoçada | 7,9 | 22°C |

A veiculação hídrica tem grande importância para a transmissão de leptospirose (ANDRADE; BRANDÃO, 1987), as condições ideais para a bactéria em água são temperatura próxima a 28°C e pH neutro ou levemente alcalino (PERRY; HEARDY, 2000). Foi encontrado DNA de *Leptospira* spp. em 13,3% das amostras de água, onde a temperatura estava entre 20°C e 24°C e o pH variou entre 6,6 e 8,0, chamando atenção para importância da água na transmissão nessas áreas, onde os animais e as

peessoas envolvidas no manejo têm contato direto com essa matriz. Acredita-se que foram encontradas amostras de água positivas com temperatura diferente da ideal, por conta da técnica de PCR detectar DNA e não a bactéria viável.

Em uma área (E) não foram obtidos animais sororeagentes para *Leptospira* spp., no entanto, foi encontrada uma amostra de água positiva, podendo ser leptospiros ambientais, o que não ameniza a importância dos roedores na contaminação de matrizes ambientais, sendo que em todas as áreas estudadas foram encontrados roedores positivos para *Leptospira* spp.

5.6. Casos de leptospirose humana

Durante o período deste estudo foram dez casos de leptospirose humana com óbito confirmado, dentro de um raio de 500m das áreas estudadas (Figuras 20 a 29), nos três distritos administrativos da região de Campo Limpo, cidade de São Paulo, SP, Brasil (SINAN NET, 2015).

Dos dez casos de leptospirose humana foi possível obter informações a respeito de três casos que foram sororeagentes pela técnica de SAM; um para os sorovares Autumnalis com titulação 3200 e Copenhageni com titulação 1600, um para Australis com titulação 1600 e Autumnalis com titulação 800 que estão próximos a área C (Figura 22) e Cynopteri com titulação 100 próximo a área H (Figura 27). O banco de dados consultado somente menciona até dois sorovares, ou seja, aqueles que tiveram as titulações mais altas (SINAN, 2015). Os sorovares encontrados nos casos humanos foram diferentes dos encontrados nos animais nas áreas próximas. É importante levar em conta que a técnica de SAM pesquisa anticorpos, e está relacionado com o sistema imunológico do indivíduo, que muda de acordo com o organismo, espécie e condições em que se vive. Comparar o sorovar não é suficiente para relacionar ou descartar os casos de leptospirose animal e humana.

Casos de leptospirose humana ocorreram em 66,7% dos limites de área avaliados (raio de 500 m) a partir das áreas com animais de criação. Dentre as áreas com casos de leptospirose humana, apenas uma área de estudo não criava animais mamíferos (área G), somente aves. Nos demais áreas que não tiveram casos de leptospirose humana dentro do raio avaliado (33,3%) predominaram em áreas de criação com aves.

O papel dos roedores na epidemiologia da doença, principalmente *R. norvegicus* se torna ainda mais importante com estes resultados. O Sistema de Saúde do município deve, desta forma, dar atenção redobrada ao controle de roedores em áreas de agricultura familiar, além de educar os produtores para o problema da

doença que pode afetar tanto os animais de criação, quanto ao ser humano que vive nas redondezas.

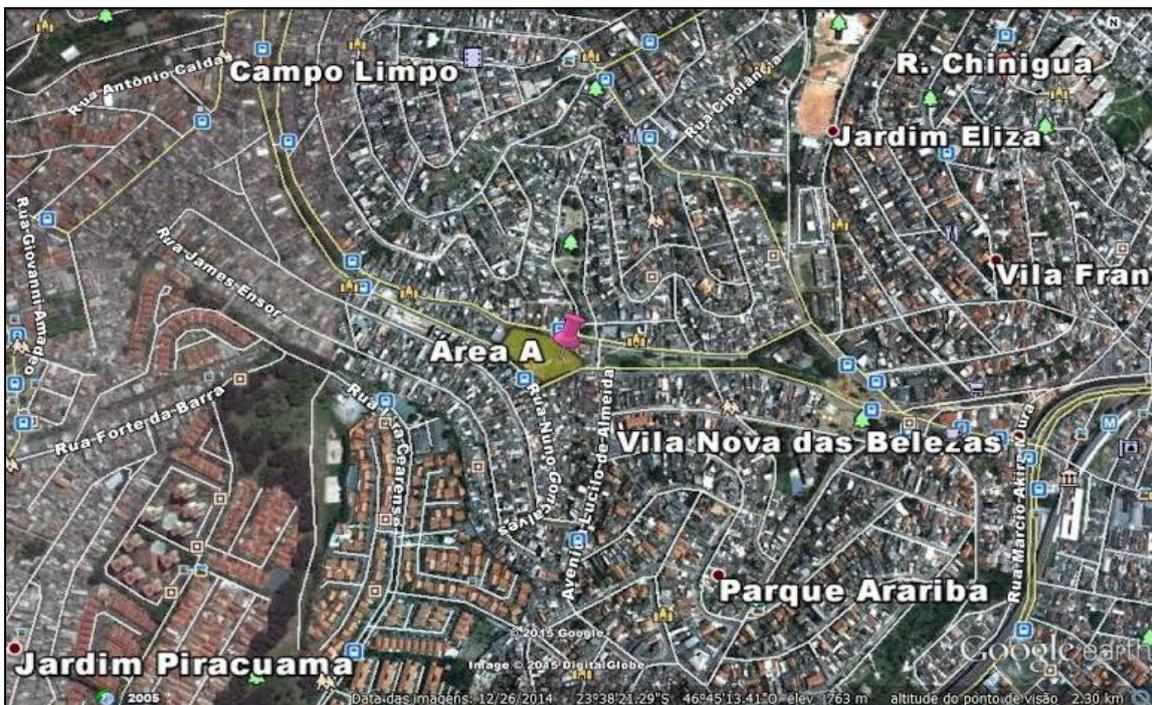


Figura 20 – Mapa da área A com nenhum caso de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP.

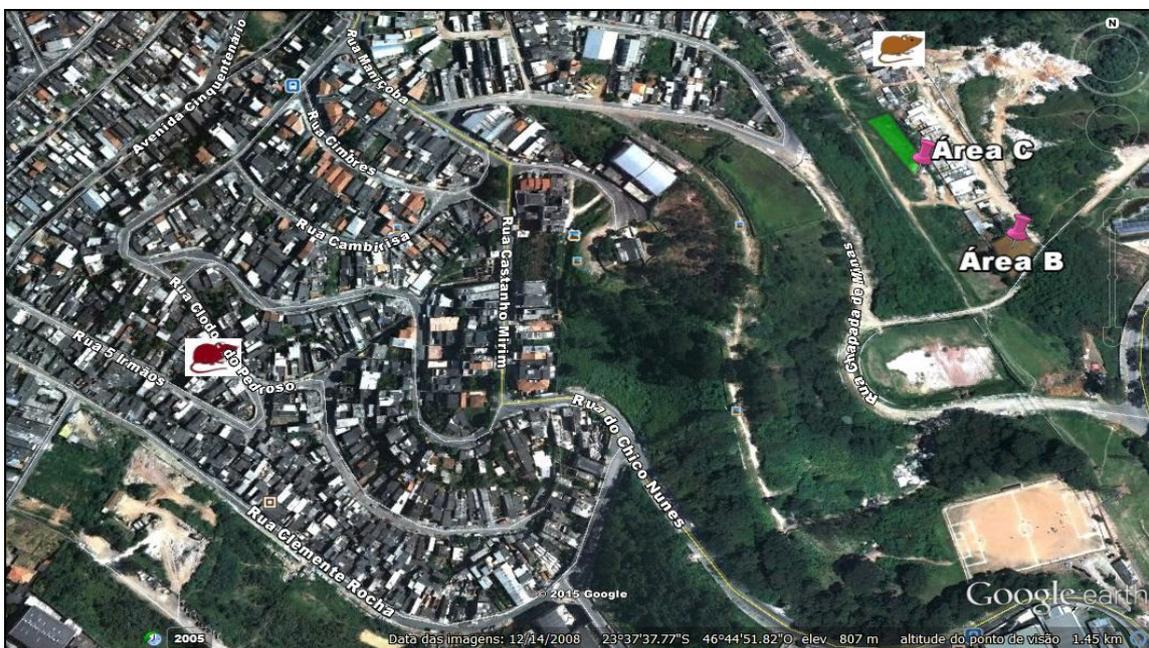


Figura 21 - Mapa da área B com os caso de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. Um caso em 2013(🐕) e um caso em 2014(🐕).

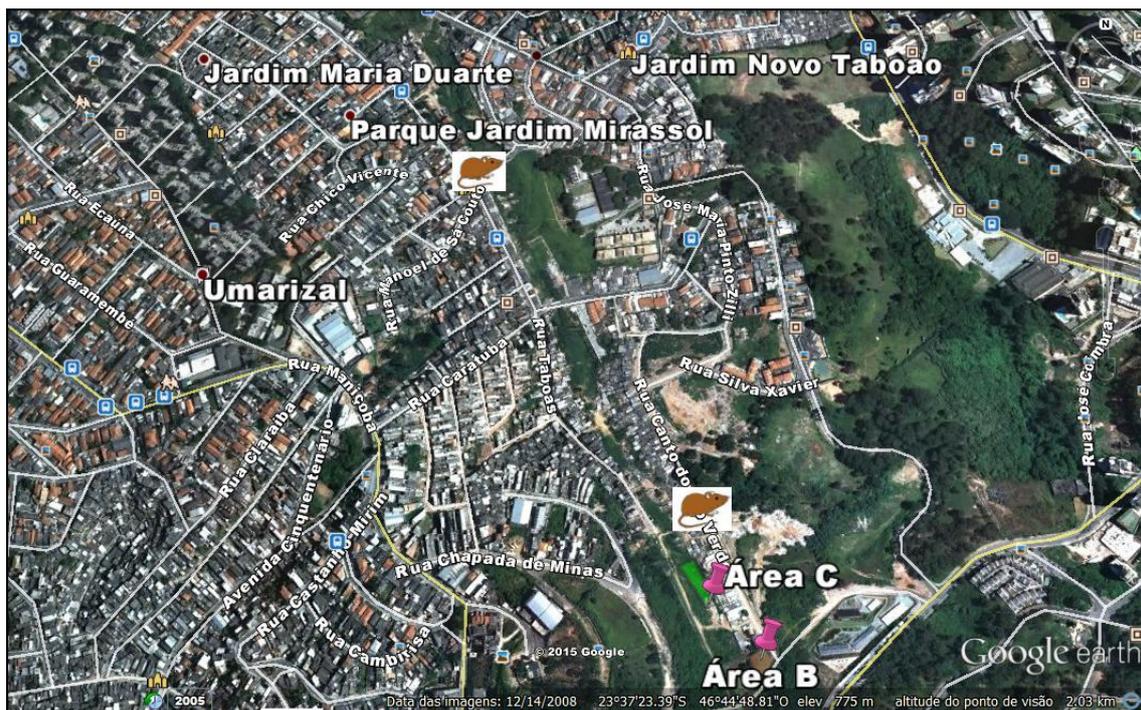


Figura 22 - Mapa da área C com os casos de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. Dois casos em 2014 (🐹).

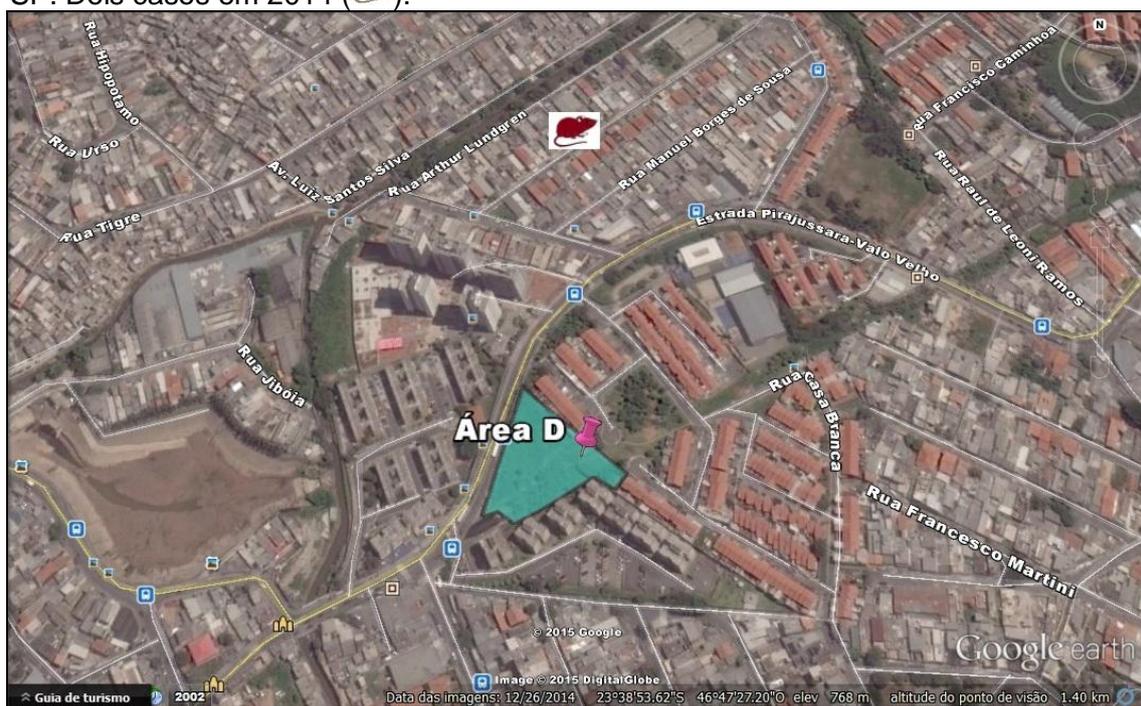


Figura 23 - Mapa da área D com um caso de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. Um caso em 2014 (🐹).



Figura 24 - Mapa da área E com os casos de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. Um caso em 2013 (🔴) e um em 2014 (🟡).

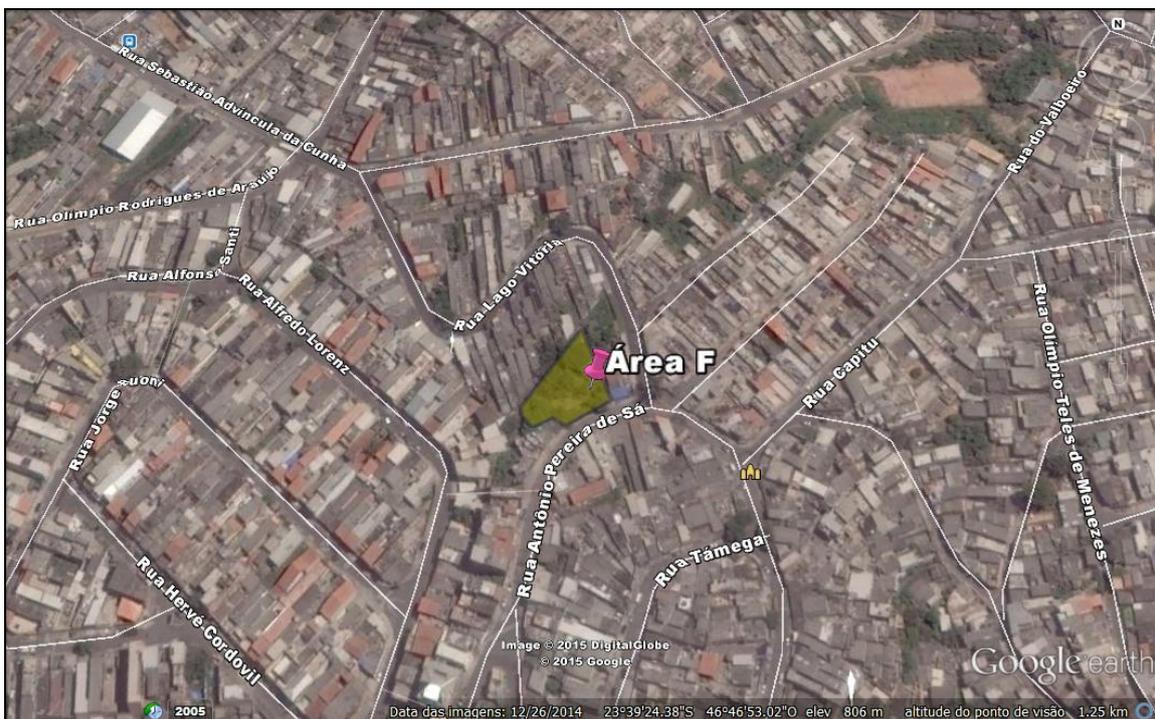


Figura 25 - Mapa da área F com nenhum caso de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP.

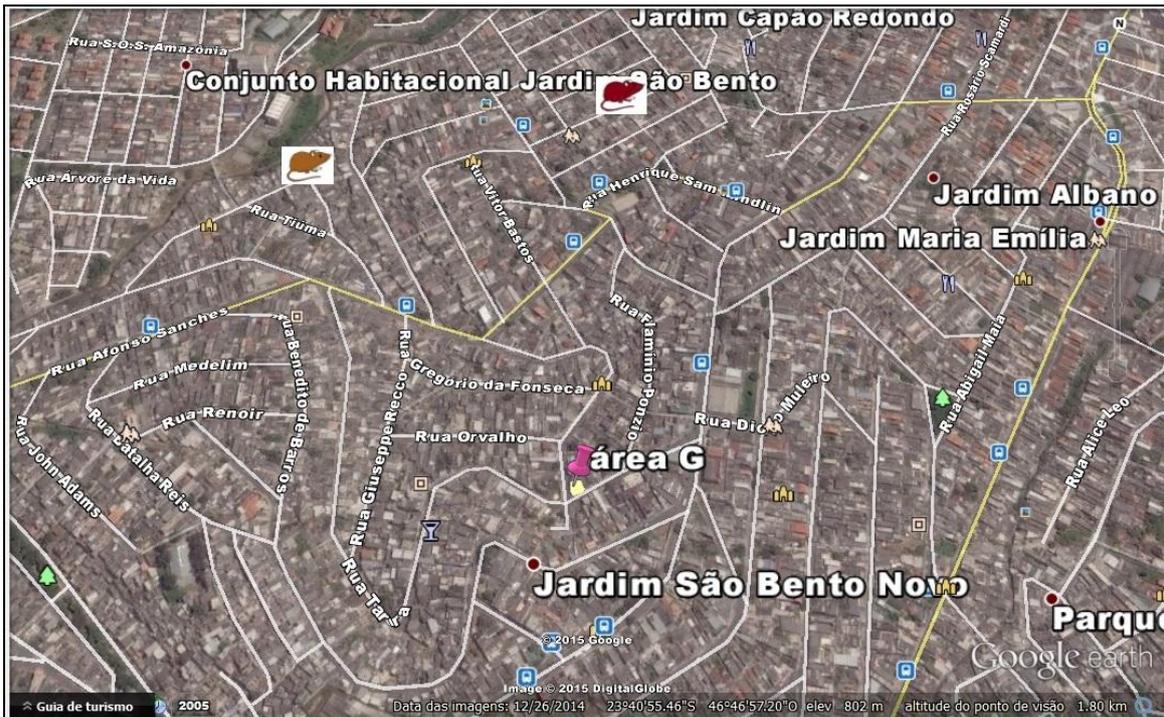


Figura 26- Mapa da área G com os casos de leptospirose em um raio de 500m humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. Um caso em 2013 (🍷) e um caso em 2014 (🍷).

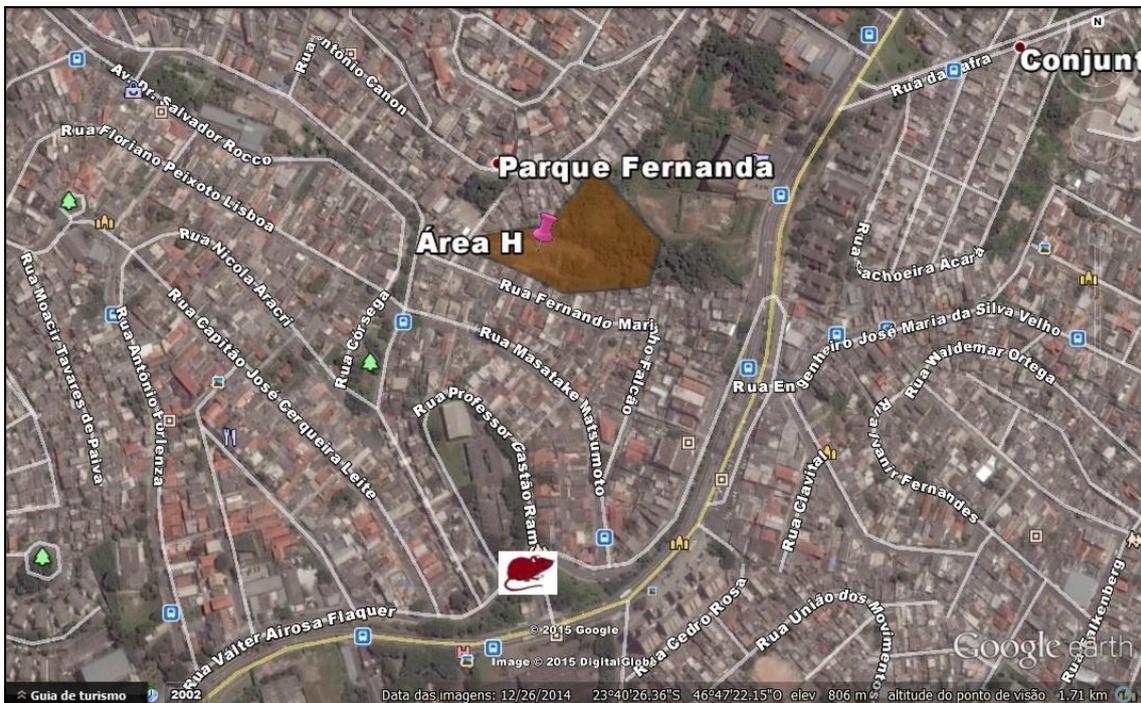


Figura 27 - Mapa da área H com os casos de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. Um caso em 2014 (🍷).

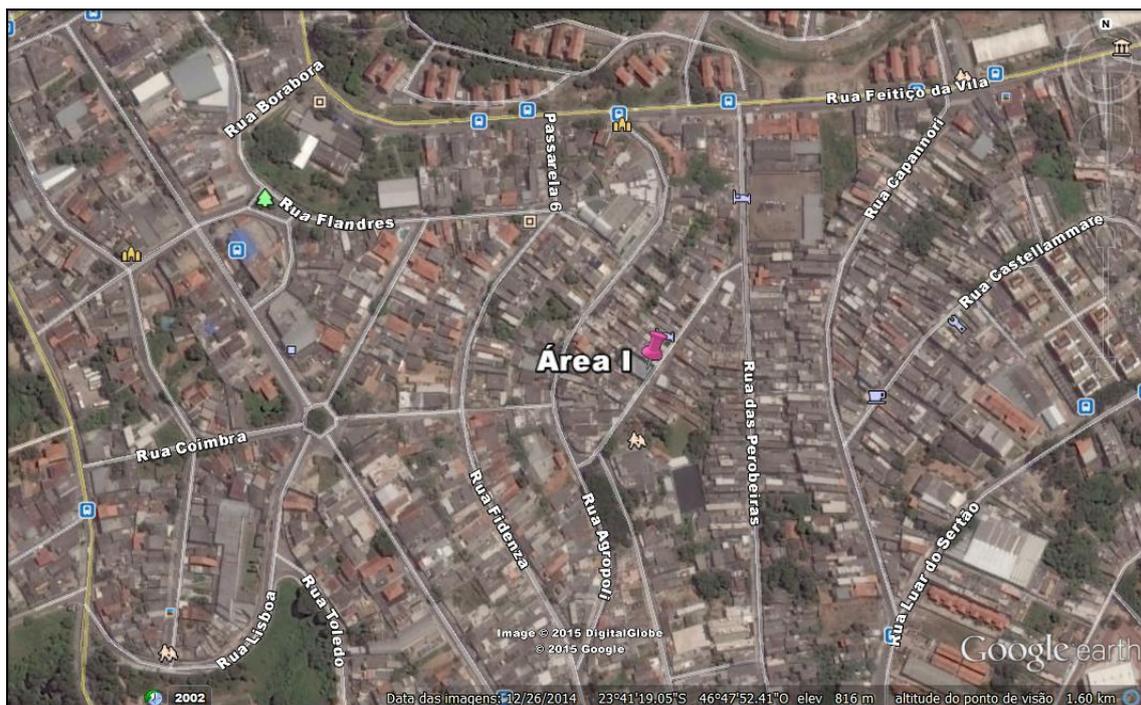


Figura 28 - Mapa da área I com nenhum caso de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP.

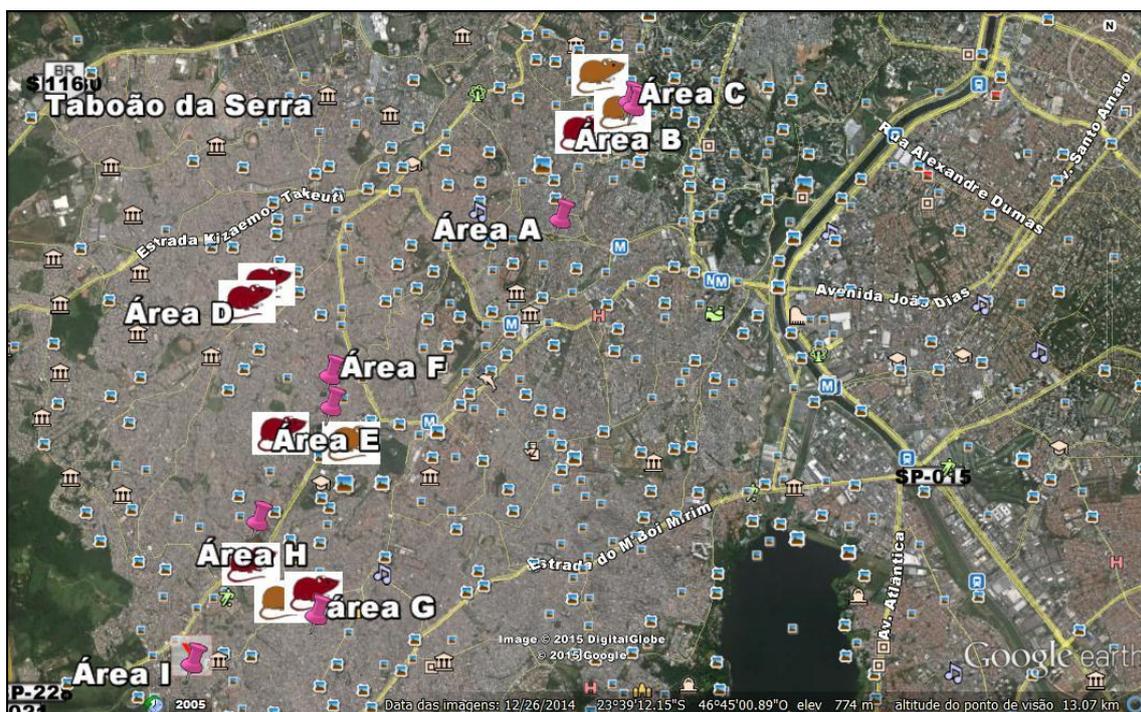


Figura 29 – Mapa com todos os casos de leptospirose humana no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015, próximos às nove áreas dentro do raio de 500m, região da Subprefeitura Campo Limpo, São Paulo, SP. Casos 2013 (🍷) e 2014 (🍷).

CONCLUSÕES

Dos 70 soros de animais de criação avaliados, 48,6% foram sororeagentes para leptospirose, inferindo-se que os diferentes sorovares de *Leptospira* spp. causadores da doença estão amplamente disseminadas em animais de criação em áreas de pecuária urbana na região da Subprefeitura Campo Limpo, cidade de São Paulo.

Leptospira Icterohaemorrhagiae foi sorovar mais frequente em animais de criação.

Um número expressivo de aves foi sororeagente para *Leptospira* principalmente para o sorovar Icterohaemorrhagiae com titulação entre 100 a 400 em galináceas e Butembo, menos frequente, com títulos entre 100 a 400 em anseriformes.

As sorologias de *R. rattus* não foram sororeagentes para *Leptospira* spp., ao contrário de *R. norvegicus*, cujos soros dos animais testados foram todos reagentes.

A análise da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) detectou positividade para todos os *R. norvegicus* capturados (30 animais) e somente dois *R. rattus*, de cinco animais capturados, confirmando a capacidade da primeira espécie como transmissor da doença.

O tamanho, idade e sexo de *R. norvegicus* não influenciaram a positividade para a presença da *Leptospira* spp.

Não foi possível relacionar as matrizes solo e água contaminados com os animais de criação infectados, uma vez que a técnica de PCR analisa amostras muito pequenas e que não espelham o que ocorre na área como um todo.

Os casos de leptospirose humana dentro do raio de 500m das áreas avaliadas podem estar relacionados com as criações de animais, em especial criações de animais mamíferos, pelo fato dos animais estarem infectados por *Leptospira* spp., os roedores presentes nessas áreas podem servir como reservatório da doença e dissemina-las para propriedades vizinhas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. C. M. **The biology and control of *Rattus rattus*** (Linneus, 1758). [Dissertation]. London (UK): University of Reading, 1990.
- ANDRADE, J.; BRANDÃO, A. P. Contribuição ao conhecimento da epidemiologia da leptospirose humana, com especial referencia ao Grande Rio, Brasil, no período de 1970 a 1982. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 91–100, 1987.
- ARIELI, K. MARTINUZZI, P. A. VIANA, A. N. JORGENS, E. N. Leptospirose, 2011.
- HARTI, A. R. *et al.* Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Diseases*, v. 3, n. December, p. 757–771, 2003.
- BRASIL. **Leptospirose diagnóstico e manejo clínico**. Brasília: [s.n.], 2014. p. 44
- BRASIL. Manual de controle de roedores. **MANUAL DE CONTROLE DE ROEDORES**. [S.l: s.n.], 2002. p. 132. Disponível em: <http://www.sbpbrasil.org/revista/edicoes/7_2/rodrigues.pdf>.
- DEMÍNICIS, B. B.; MARTINS, C. B. *Ciência Animal III Bruno Borges Deminicis Bruno Borges Deminicis & Carla Martins*. CAUFES ed.Alegre (ES): [s.n.], 2014. p. 366
- BEVILAQUA, PD; CARMO, RF; SILVA, JCP; GIUDICE, GML. Roedores inventariados em hospital veterinário e fragmento de mata nativa da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil: caracterização populacional e infecção por *Leptospira* sp. *Cienc. Rural* vol.34 no.5 Santa Maria Sept./Oct. 2004, disponível em <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000500030>, acesso 28 de janeiro de 2013.
- CORDEIRO, F.; SULZER, C. R.; RAMOS, A. *Leptospira interrogans* in several wildlife species in Southeast Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 1(1), 19-29, 1981.
- DAVIS D. E.; CHRISTIAN J. J. Population consequences of a sustained yield program for Norway rats. **Ecology** 39:217–222, 1958.
- DHALIWAL, G.S.; MURRAY, R.D.; DOBSON, H.; MINTGOMERY, J.; ELLIS, W.A. Effect of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection on milk yield in endemically infected dairy herds. **Veterinary Record**, London , v.139, p.319-320, 1996.]
- ESTEVES, F. M.; GUERRA-NETO, G.; GIRIO, R.J.da S.; SILVA-VERGARA, M. L.; CARVALHO, A. C. de F. B. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. em animais e funcionários do zoológico municipal de Uberaba, MG. **Arquivo do Instituto Biológico**., São Paulo, v.72, n.3, p.283-288, 2005.
- FAINE, S. **Leptospira and Leptospiroses**. 2ed. Melbourne: MediSci, 1999.
- GONCALVES, A. J. R. *et al.* Formas graves do síndrome de weil *. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 3.2, p. 94–100, 1969.
- GARCIA, NO. Roedores em áreas urbanas. **O Biológico**, v. 60, separata, 1998.

GAUDIE, CM; FEATHERSTONE, CA; PHILLIPS, WS; MCNAUGHT, R; RHODES, PM; ERRINGTON, J; FEARNLEY, C; FENNER, JS; PRITCHARD, GC. Human *Leptospira interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae infection (Weil's disease) acquired from pet rats. **Veterinary Record**, v. 15, n. 163, p. 599-601, 2008.

GLUBER, D. J.; REITER, P.; EBI, K. L.; YAP, W.; NASCI, R.; PATZ, J. A. Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector and rodent borne diseases. **Environmental Health Perspectives**, New York, v. 109, supplement 2, 2001.

HENRY, R.A.; JOHNSON, R.C. Distribution of the genus *leptospira* in soil and water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.35, n.3, p. 492-499, 1978.
HIGGINS, R. J.; HARBOURNE, J.F.; LITTLE, T. W. A.; STEVENS, A. E. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospira* of serotype *Hardjo*. **Veterinary Record**, v. 27, n. 9, p. 307-309, 1980.

HUNDER, P. *Leptospira*. p. 1444 – 1456, 2004.

IBGE. *Instituto Brasileiro de Geografia Estatística*. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2161&id_pagina=1>. Acesso em: 25 jan. 2013.

JACOBI, P. *Cidade e meio ambiente: percepções e práticas em São Paulo*. 2^a. ed. São Paulo: [s.n.], 2006. p. 206

KEINER, C. Wartime rat control, rodent ecology, and the rise and fall of chemical rodenticides. **Endeavour**, v. 29, n. 3, p. 119-125, 2005.

KRØJGAARD, LH; VILLUMSEN, S; MARKUSSEN, MD; JENSEN, JS; LEIRS, H; HEIBERG, AC. High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*). **Epidemiology and Infection**. v. 27, p. 1-7, 2009.

MOUGEOT, L. J. A. Agricultura urbana: conceito e definição. *Revista Agricultura Urbana*, p. 8, 2005. Disponível em:
<<http://www.ruaf.org/sites/default/files/AU1conceito.pdf>>.

MASI, E; VILAÇA, P; RAZZOLINI, MTP. Environmental conditions and rodent infestation in Campo Limpo district, São Paulo municipality, Brazil International. **Journal of Environmental Health Research** v. 19, n. 1, p. 1–16, 2009.

MEEHAN, A. P. **Rats and mice**: their biology and control. Felcourt (UK): Rentokil, 1984. 383 p.

MONTES, A. S. DIMAS, J. S. RODRIGUES, F. J. P. La rata y El perro, importantes vectores de La leptospirosis em explotaciones pecuarias de Cd. Guzmán, Jalisco. **Revista Cubana de Medicina Tropical**. V.54, n. 1, 2002.

OCHOA, J. E. SÁNCHEZ, A. RUIZ, I. Epidemiología de La leptospirosis en una zona andina de producción pecuária, 2000.

OLIVEIRA, S. V. DE; ARSKY, M. D. L. N. S.; CALDAS, E. P. DE. Reservatórios animais da leptospirose : Uma revisão bibliográfica. *Saúde*, v. 39, p. 9–20, 2013.

PAPINI, S. **Vigilância em saúde ambiental**: uma nova era da ecologia. Editora Atheneu, 2008, 186p.

PAULA, E. V. Leptospirose humana: uma análise climato-geográfica de sua manifestação no Brasil, Paraná e Curitiba. **Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Goiânia, Brasil, 2005, p. 2301-2308.

POTENZA, M & ZORZENON, FJ. *In*: ZORZENON, FJ & JUSTI, J. (ed) Manual ilustrado de pragas urbanas e outros animais sinantrópicos. **Instituto Biológico**, 2006, p. 139-144.

PMSP. *Subprefeitura Campo Limpo*. Disponível em:
<http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/subprefeituras/campo_limpo/>. Acesso em: 9 abr. 2015.

ROSSETTI, C.; VANASCO, B.; PINI, N. Comparison of three diagnostic techniques for the detection of leptospire in the kidneys of wild house mice (*Mus musculus*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, n. 1, p. 6–10, 2004. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2004000100003&script=sci_arttext>.

SINAN NET. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Ministério da Saúde. Consultado em 24 de setembro de 2014.

SOARES, TSM; LATORRE, MRDO; ZORELLO LAPORTA, GZ^{III}; MÁRCIA REGINA BUZZARR, MR. Análise espacial e sazonal da leptospirose no município de São Paulo, SP, 1998 a 2006. *Rev. Saúde Pública* v. 44 n.2, 2010, disponível em <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102010000200008>, acessado em 29 de janeiro de 2013.

SUPUTTAMONGKOL, Y. PONGTAVORNPINYO, W. LUBELL, Y. SUTTINONT, C. HOONTRAKUL, S. PHIMDA, K. LOSUWANALUK, K. SUWANCHAROEN, D. CHIERAKUL, S. W. DAY, N. Strategies for Diagnosis and Treatment of Suspected Leptospirosis: A Cost-Benefit Analysis, 2010.

WHISHAW, I. Q.; WHISHAW, G.E. Conspecific aggression influences food carrying: studies on a wild population of *Rattus norvegicus*. **Aggressive Behavior** 22:47–66, 1996.

SANTOS, A. D. S. *Infecção experimental em suínos por <i>Leptospira interrogans</i> sorogrupo *icterohaemorrhagiae* e *pomona**. 2014. Universidade Federal de Goiás Escola de Veterinária e Zootecnia. Tese, 2014.

SOTO, F. R. . *et al.* Leptospirose Suína. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 74, p. 379–395, dez. 2007.

8. ANEXOS

Anexo 1 – Questionário voltado para risco de presença de *Leptospira* spp.:

1. Tipo criação?
Animais encontrados na propriedade.
2. Baia para mamíferos?
Sim ou não.
3. Viveiros para as aves?
Sim ou não.
4. Sala para ração?
Sim ou não.
5. Mangueira para lavagem?
Sim ou não.
6. Energia elétrica?
Sim ou não.
7. Água encanada?
Sim ou não
8. Exploração econômica?
Extensiva, semi-intensiva ou intensiva.
9. Vegetação de boa qualidade?
Sim ou não.
10. Uso de vacinas nos animais?
Sim ou não.
11. Suplementos alimentares na alimentação dos animais?
Sim ou não.
12. Uso de vitaminas nos animais?
Sim ou não.
13. Bebedouros na propriedade?
Sim ou não.
14. Acesso dos animais a córrego ou esgoto?
Sim ou não
15. Vermifugação e controle de helmintos nos animais?
Sim ou não.
16. Exames periódicos nos animais?
Sim ou não.
17. Higienização do local de criação?

Sim ou não.

18. Presença de lixo e inservíveis nas propriedades?

Sim ou não.

19. Controle de roedores?

Sim ou não.

20. Acesso dos animais a vias pública e a bueiros?

Sim ou não.

21. Estrutura do imóvel favorece a procriação de roedores?

Sim ou não.

Anexo 2 – Procedimento de captura de roedores.



Prefeitura do Município de São Paulo
Secretaria Municipal da Saúde
Coordenadoria Regional de Saúde Sudeste
SUVIS Vila Mariana / Jabaquara

PROCEDIMENTO PARA CAPTURA DE ROEDORES

1. OBJETIVO

Indicar o procedimento seguro a ser seguido para captura de *Rattus norvegicus*.

2. SEGURANÇA DO TRABALHADOR

Uso de uniforme de trabalho constituído de calça comprida, calçado fechado anti-derrapante e camiseta, boné e óculos com proteção UV) e de EPI composto por avental descartável, máscara para partículas PFF2, luvas de expurgo e luvas de procedimento, luvas nitrílica e máscara para partícula (PFF2) com filtro químico

Vacinas anti-rábica e anti-tetânica atualizadas.

3. MATERIAIS

Armadilhas, pinças, caixas plásticas, bandejas plásticas, frascos de vidro com tampa contendo álcool etílico 70%, pulverizadores plásticos manuais 500 mL, recipiente para preparo da calda de DDVP, DDVP, água (para preparo da calda), proveta graduada, etiquetas para identificação de espécimes e de ectoparasitas, caneta, lápis, planilha de identificação dos animais, clipe de aço, fita adesiva, sacos plásticos pretos, sacos plásticos autoclaváveis, tunil.

4. PROCEDIMENTO

4.1 Usar uniforme de trabalho

Selecionar locais com alta infestação de roedores

Solicitar autorização do munícipe (se for o caso) para colocação das armadilhas

4.2 Usar uniforme de trabalho e luvas de procedimento

Colocar armadilhas desarmadas durante 7 dias para que os animais se acostumem ao novo objeto.

Colocar armadilhas armadas contendo alimento no final da tarde

Após ± 12 horas da colocação verificar as armadilhas (possibilidades: perda de armadilha, armadilhas vazias, armadilhas com animais capturados)

4.2.1 Armadilhas Vazias

SUVIS Vila Mariana-Jabaquara
Rua Carlos Gerolamo Mônaco, 169 Vila Mariana, São Paulo, SP CEP: 04121-050
Fone: (11) 5575 1964, 5084 5372, 5083 5241



Prefeitura do Município de São Paulo
 Secretaria Municipal da Saúde
 Coordenadoria Regional de Saúde Sudeste
 SUVIS Vila Mariana / Jabaquara

- Usar uniforme de trabalho e luvas de procedimento
- Desarmar as armadilhas
- Retirar o alimento
- Recolocar armadilha no final da tarde seguindo o procedimento 4.2

4.2.2 Armadilhas com Animais Capturados

- Usar uniforme de trabalho
- Colocar avental descartável sobre o uniforme de trabalho
- Colocar máscara para partículas PPF2, óculos de segurança e luvas de procedimento (NESTA SEQUÊNCIA)
- Colocar luvas nitrílica sobre as luvas de procedimento
- Preparar 101mL de calda de DDVP é necessário colocar 100mL de água, medida em proveta, e adicionar 1mL de solução aquosa de DDVP, usar medidor da embalagem e coloca-la em pulverizador plástico de 500 mL
- Cobrir a armadilha com saco plástico preto, coloca-la sobre uma bandeja plástica e removê-la do local levando-a para a caçamba da viatura
- Esperar o animal se acalmar
- Retirar as luvas nitrílicas
- Colocar as luvas de expurgo (sobre as luvas de procedimento)
- Remover o saco plástico preto
- Colocar sobre a armadilha um pedaço de tunil e prendê-lo sob a bandeja plástica
- Colocar saco plástico preto parcialmente sobre o tunil
- Esperar o animal se acalmar
- Aspergir, pela lateral, xx mL de calda de DDVP com pulverizador manual de 500 mL (procurando não atingir os olhos do animal)
- Esperar o animal se acalmar
- Remover o saco plástico preto (deixar o tunil) e colocá-lo em saco de lixo para descarte
- Esperar o animal secar (\pm 20 min)
- Remover o tunil e colocá-lo em saco de lixo para descarte
- Tirar a armadilha da bandeja plástica e coloca-la na caixa plástica
- Cobrir a caixa plástica com tunil e saco plástico preto
- Recolher, com pinça, os ectoparasitas que ficaram na bandeja plástica e coloca-los em frasco de vidro com tampa contendo álcool etílico 70%



Prefeitura do Município de São Paulo
Secretaria Municipal da Saúde
Coordenadoria Regional de Saúde Sudeste
SUVIS Vila Mariana / Jabaquara

Colocar a bandeja plástica em saco plástico preto para lavá-la no IB
Identificar o animal capturado numerando-o e anotando em planilha data e local da captura, sexo, condições aparentes

- Identificar o frasco com ectoparasitas, usar o mesmo número do animal
- Retirar as luvas de expurgo e colocá-las em saco plástico para higienização no IB
- Retirar o avental descartável e colocá-lo em saco plástico autoclavável
- Retirar os óculos de segurança e coloca-lo em saco plástico para higienização no IB
- Retirar a máscara PFF2 e guardá-la em envólucro próprio
- Levar o animal capturado até o IB
- Encaminhar os ectoparasitas para identificação (SUVIS, CCZ)

Se a armadilha estiver suja, trocar o animal de armadilha após o banho de DDVP, secagem, recolhimento dos ectoparasitas e identificação do animal e do frasco com ectoparasitas, seguindo as etapas abaixo

Retirar a armadilha suja da bandeja plástica e coloca-la sobre o chão.

Sobre o solo (NÃO FAZER ESTE PROCEDIMENTO SOBRE A CAÇAMBA DA VIATURA), colocar a armadilha com o animal capturado frente a frente com armadilha limpa e prendê-las com clipe de aço

Levantar a abertura da armadilha limpa, depois levantar a abertura da armadilha onde se encontra o animal

Estimular o animal a trocar de armadilha, batendo levemente onde ele se encontra

Após o animal se deslocar, fechar primeiro a abertura da armadilha suja e em seguida a abertura da armadilha limpa, onde agora se encontra o animal

Tirar o clipe e soltar as armadilhas

Colocar a armadilha com o animal na caixa plástica

Cobrir a caixa plástica com tunil e saco plástico preto para encaminhamento ao IB

Retirar as luvas de expurgo e colocá-las em saco plástico para higienização no IB

Retirar o avental descartável e colocá-lo em saco plástico autoclavável

Retirar os óculos de segurança e coloca-lo em saco plástico para higienização no IB

Retirar a máscara PFF2 e guardá-la em envólucro próprio

5. ENTREGA DOS ANIMAIS NO IB

Colocar avental descartável novo, luvas de procedimento (novas) sob luvas de expurgo limpas, óculos de segurança limpos e a máscara para partículas PFF2

Levar as caixas plásticas, contendo as armadilhas, cobertas por saco plástico preto até a entrada



Prefeitura do Município de São Paulo
 Secretaria Municipal da Saúde
 Coordenadoria Regional de Saúde Sudeste
 SUVIS Vila Mariana / Jabaquara

da quarentena

Entregar os animais para o funcionário na quarentena

Após retirada da armadilha cobrir a caixa plástica com tunil e saco plástico preto

Levar as bandejas e as caixas plásticas para higienização na área externa protegida do Biotério

Na área externa protegida do Biotério remover o saco plástico preto e o tunil das caixas e colocá-los em saco de lixo para descarte

Coletar ectoparasitas presentes e coloca-los em frasco de vidro identificado (com o mesmo número do roedor) contendo álcool etílico

NÃO RETIRAR O EPI (avental descartável, luvas de procedimento sob luvas de expurgo, óculos de segurança e a máscara para partículas PFF2)

6. HIGIENIZAÇÃO DAS BANDEJAS E CAIXAS PLÁSTICAS PRETAS

Retirar as luvas de expurgo

Retirar os óculos de segurança e colocá-los em recipiente para posterior higienização

Retirar a máscara PFF2

CONTINUAR USANDO O AVENTAL DESCARTÁVEL E AS LUVAS DE PROCEDIMENTO

Colocar a máscara para partículas no envólucro próprio

Recolocar as luvas de expurgo sobre as luvas de procedimento

Lavar as caixas e bandejas com água e sabão

Deixar na área externa protegida para secar

7. HIGIENIZAÇÃO DAS LUVAS DE EXPURGO E ÓCULOS DE SEGURANÇA

Retirar as luvas de expurgo

Colocar luvas de látex sobre as luvas de procedimento para lavar as luvas de expurgo com água e sabão

Deixar as luvas de expurgo para secar na área externa protegida do Biotério

Retirar as luvas de látex e limpar os óculos de segurança com água e sabão, enxaguar com bastante água, secar com pano limpo e macio e guardar em recipiente próprio.

Retirar o avental descartável e as luvas de procedimento (NESTA SEQUÊNCIA) e colocá-los em saco plástico autoclavável

Anexo 3 - Certificado do CETEA.



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 123/12** sobre o Projeto: “**Avaliação da eficácia da formulação em bloco de rodenticida contendo o ingrediente ativo bromadiolona**”, sob a responsabilidade de **Emerson Sanches Narciso e Lia Emi Nakagawa**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA).

Protocolo inicialmente aprovado pela CETEA-IB em 28 de março de 2012 e renovado em 24 de julho de 2013.

São Paulo, 24 de julho de 2013


Ricardo Spacagna Jordão
Coordenador da CETEA-IB

CETEA - IB**Registro****Número : 123/12****Livro : 02****Folha : 23****Data : 24/07/13**