

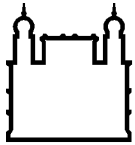
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo  
Cruz/FIOCRUZ

**Pesquisa de anticorpos anti- hantavírus em casos suspeitos de leptospirose em um  
Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde para Leptospirose (2008-2011)  
no Rio de Janeiro**

**ANGÉLICA TAPIA DE LIMA BARBOSA**

Rio de Janeiro  
Abril 2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*Angélica Tapia de Lima Barbosa*

**Pesquisa de anticorpos anti- hantavírus em casos suspeitos de leptospirose em um Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde para Leptospirose (2008-2011) no Rio de Janeiro**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

**Orientador (es):** Prof. Dr. Elba Regina Sampaio de Lemos  
Prof. Dr. Martha Maria Pereira

**RIO DE JANEIRO**

Abril 2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

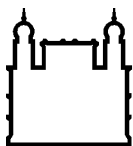
B238 Barbosa, Angélica Tapia de Lima

Pesquisa de anticorpos anti-hantavírus em casos suspeitos de leptospirose em um Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde para Leptospirose (2008-2011) no Rio de Janeiro / Angélica Tapia de Lima Barbosa. – Rio de Janeiro, 2014.  
x,57 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.  
Bibliografia: f. 39-56

1. Síndrome pulmonar por Hantavírus. 2. Forma pulmonar da Leptospirose. 3. Diagnóstico diferencial. 4. Vigilância epidemiológica das zoonoses. I. Título.

CDD 616.959



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***AUTOR: ANGÉLICA TAPIA DE LIMA BARBOSA***

**Pesquisa de anticorpos anti- hantavírus em casos suspeitos de leptospirose em um Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde para Leptospirose (2008-2011) no Rio de Janeiro**

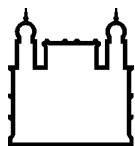
**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Elba Regina Sampaio de Lemos**  
**Prof. Dr. Martha Maria Pereira**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Martha Cecília Mutis Suarez (IOC/FIOCRUZ) - Presidente e Revisora**  
**Prof. Dr. Katia Eliane Santos Avelar (IOC/ FIOCRUZ)**  
**Prof. Dr. Paulo Vieira Damasco (UERJ/UNIRIO)**  
**Prof. Dr. Márcio Neves Bóia (IOC-FIOCRUZ/UERJ) - suplente**  
**Prof. Dr. Renata Carvalho de Oliveira (IOC/FIOCRUZ) - suplente**

Rio de Janeiro, de abril de 2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

**Dedicatória**

**Ao meu amado e iluminado filho  
Guilherme Tapia Lemos que esteve ao  
meu lado em todas as etapas desta obra**

## **AGRADECIMENTOS**

À querida orientadora Dra Elba Regina Sampaio de Lemos

A todos os colegas do Laboratório de Referência em Hantavírus e Rickettsias (LHR),  
principalmente Raphael Gomes e Renata Carvalho

As amizades e o carinho com a Equipe do Laboratório de Referência Nacional em  
Leptospirose (LRNL)

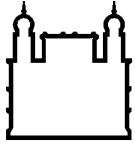
Ao apoio e dedicação da Professora Rosany Bochner

Ao querido e grande Mestre Prof Paulo Damasco

A Fiocruz

A CAPES

A toda minha família, amigos e colaboradores que me auxiliaram na execução deste projeto



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pesquisa de anticorpos anti- hantavírus em casos suspeitos de leptospirose em um Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde para Leptospirose (2008-2011) no Rio de Janeiro**

#### **RESUMO**

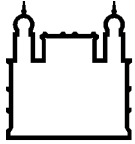
#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL**

**Angélica Tapia de Lima Barbosa**

A leptospirose é uma zoonose endêmica no Brasil e no Estado do Rio de Janeiro caracteriza-se como uma doença infecciosa febril aguda, potencialmente fatal, principalmente na forma pulmonar. Esta doença tem manifestação proteiforme que requer diagnóstico diferencial com várias doenças infecciosas endêmicas, fato que torna seu diagnóstico difícil e complexo, em especial nos períodos de epidemias. Entre estas doenças infecciosas, destaca-se a síndrome pulmonar por hantavírus (SPH), uma zoonose emergente restrita às Américas, adquirida a partir de roedores silvestres, cujo espectro clínico varia, de doença febril aguda inespecífica a quadros pulmonares e cardiovasculares mais graves e fulminantes caracterizados por insuficiência respiratória com letalidade de 40 a 60%. Considerando que ambas as zoonoses têm os roedores como reservatórios e apresentam particularidades clínicas semelhantes, principalmente com relação à forma pulmonar da leptospirose (FPL) e a SPH, torna necessário o diagnóstico diferencial em pacientes com quadro infeccioso agudo febril com manifestação respiratória procedentes de áreas onde existam espécies de roedores silvestres infectadas. Embora até a presente data nenhum caso de SPH tenha sido notificado no estado do Rio de Janeiro, roedores silvestres infectados com vírus Juquitiba, o genótipo mais frequentemente associado com a doença humana no Brasil, já foram identificados no território fluminense, na divisa com os estados de Minas Gerais e São Paulo, onde há casos de SPH, reforçam a necessidade de estudos. A proposta desse estudo retrospectivo foi (i) analisar os dados clínico-epidemiológicos das amostras de casos suspeitos de leptospirose encaminhadas para o Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde para Leptospirose do Instituto



Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, no período de 2008 a 2011 e (ii), investigar a presença de infecção por hantavírus, utilizando teste sorológico - antígeno recombinante HANTEC, em amostras de casos suspeitos, soronegativas para leptospirose, procedentes dos municípios do estado do Rio de Janeiro, onde roedores infectados por hantavírus foram identificados. Foram analisadas amostras de 108 casos suspeitos negativos sorologicamente para leptospirose, sendo 88% das amostras provenientes do Laboratório Central Noel Nutels (LACEN) e as demais procedentes de hospitais gerais. O sexo masculino correspondeu a maioria, com 77% dos casos, numa faixa etária predominante dos 20-29 anos e 30-39 anos. História epidemiológica positiva para presença de roedores foi verificada em 28.7% dos casos e no período de maior precipitação pluviométrica, respeitando a sazonalidade da leptospirose. Em relação à análise clínica, a frequência das manifestações foi: mialgia (87%), icterícia (47.2%), anúria (31.5%), oligúria (31.5%), cefaleia (18.5%), congestão conjuntival (18.5%), sinais hemorrágicos (12%) e hemorragia pulmonar (6.5%). A análise sorológica dessas amostras, que atenderam aos critérios de inclusão para a pesquisa de hantavírus, mostrou-se negativa. Embora mais estudos sejam necessários, os resultados obtidos apontam para a ausência de infecção por hantavírus em amostras humanas de casos suspeitos de leptospirose na forma pulmonar em um estado onde, curiosamente, o vírus Juquitiba, identificado no roedor reservatório *Oligoryzomys nigripes*, se encontra, com base na análise filogenética, separado dos outros hantavírus Juquitiba identificados no território brasileiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Research of anti-hantavirus antibodies in suspected cases, but discarded, leptospirosis in a Collaborating Center of the World Health Organization for Leptospirosis (2008-2011) in Rio de Janeiro**

#### **ABSTRACT**

#### **MASTER DISSERTATION IN TROPICAL MEDICINE**

**Angélica Tapia de Lima Barbosa**

Leptospirosis is an endemic zoonosis in Brazil and in the State of Rio de Janeiro that is characterized as an acute, potentially fatal febrile infectious disease, especially in the pulmonary form. This disease has a dynamic manifestation that requires differential diagnosis with several endemic infectious diseases, due to its distribution in the same geographical areas, a fact which makes its diagnosis difficult and complex, especially in periods of epidemics. Among these infectious diseases, there is the hantavirus pulmonary syndrome (HPS), also known as hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS) an emerging zoonosis restricted to the Americas, acquired from wild rodents, whose clinical spectrum ranging from acute febrile illness nonspecific more severe and fulminant pulmonary and cardiovascular frames characterized by respiratory insufficiency with mortality 40-60%. Whereas both zoonoses have rodents as reservoirs and present similar clinical features, mainly between the pulmonary form of leptospirosis (PFL) and HPS, differential diagnosis is necessary in patients with acute febrile infection with respiratory manifestation coming from areas where there are species of wild rodents. Although no cases of HPS have been reported in the State of Rio de Janeiro, with infected wild rodents Jukitiba virus genotype most often associated with human disease in Brazil, have been identified in Rio de Janeiro territory, whose border with the states of Minas Gerais and São Paulo, where there are cases of HPS, reinforces the need for studies. The purpose of this retrospective study was to (i) analyze the clinical and epidemiological data of samples of suspected leptospirosis forwarded to the WHO Collaborating Centre of the World Health Organization for Leptospirosis Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro cases in the period 2008-2011 and (ii) investigate the presence of hantavirus infection using serologic testing - recombinant antigen in samples from suspected cases, but laboratory negative for leptospirosis, coming from the municipalities of the State of Rio de Janeiro, where rodents infected with hantaviruses have been identified. 108 suspected cases were serologically negative for leptospirosis, with 88% of the samples from the Central Laboratory Noel Nutels (LACEN) and the other coming from General Hospitals. Males comprised the majority with 77% of cases, a predominant age group of 20-

29 years and 30-39 years, positive for the presence of rodents in 28.7% of cases and in the period of greatest rainfall epidemiological history, respecting the seasonality of leptospirosis. In relation to clinical analysis, the frequency of events is: myalgia (87%), jaundice (47.2%), anuria (31.5%), oliguria (31.5%), headache (18.5%), conjunctival injection (18.5%), signs bleeding (12%) and pulmonary hemorrhage (6.5%). Serological analysis of these samples, which met the inclusion criteria for the detection of hantavirus was negative. Although more studies are needed, the results point to the absence of hantavirus infection in human specimens in a state where, interestingly, the Jucituba virus identified in rodent reservoir *Oligoryzomys nigripes*, is based on phylogenetic analysis, separate from other Jucituba identified hantavirus in Brazil.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
Leptospiroses .....	2
Epidemiologia da Leptospirose.....	3
Patogenia da Leptospirose.....	4
Critérios para definição de caso de forma pulmonar da leptospirose (FPL) .....	4
Manifestações Clínicas.....	5
Diagnóstico Clínico Diferencial e Laboratorial.....	6
Tratamento e Medidas Preventivas.....	8
Hantaviroses .....	9
Epidemiologia da SPH .....	10
Patogênese da SPH.....	12
Critérios para Definição de Caso de SPH .....	12
Manifestações Clínicas.....	13
Diagnóstico Clínico Diferencial e Laboratorial.....	13
Tratamento e Medidas de Prevenção .....	16
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>17</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
3.1. Objetivo Geral .....	18
3.2. Objetivos Específicos .....	18
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
4.1.Desenho e Local de Estudo .....	19
4.2.Seleção e caracterização da população de estudo.....	20
4.3.Descrição das variáveis estudadas .....	21
4.4.Atividades Laboratoriais .....	22
4.5.Considerações Éticas.....	26
4.6.Análise estatística .....	27
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
6.2.. Pesquisa de anticorpos anti-hantavírus .....	35
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>38</b>
<b>8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>39</b>
<b>9.ANEXOS</b> .....	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1 Natureza bifásica da leptospirose (Levett 2001) .....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 1.2 Mapa da América do Sul evidenciando distribuição dos hantavírus causadoresn de SPH e seu roedor-reservatório (Figueiredo LTM et al Virus Research 2014).....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 1.3 Transmissão do hantavírus (adaptado Pincelli 2003).....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 4.1 Número de amostras pesquisadas soronegativas para leptospirose distribuídas por município do Estado do Rio de Janeiro no período de 2008 a 2011.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 5.1 Distribuição, quanto a procedência, dos casos suspeitos de leptospiroses, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011).....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 5.2 Distribuição, quanto ao sexo, dos casos suspeitos de leptospiroses, soronegativos, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011).....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 5.3 Distribuição, quanto à faixa etária, dos casos suspeitos de leptospiroses, soronegativos, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011).....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 5.4 Distribuição mensal dos casos suspeitos de leptospiroses, soronegativos, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011). .....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 5.5 Distribuição, em relação à sazonalidade e aos índices pluviométricos, dos casos suspeitos de leptospiroses, soronegativos, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011). .....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 5.6 Distribuição, em relação ao local provável de infecção e atividade relacionada à exposição, dos casos suspeitos de leptospiroses, soronegativos, cujas amostras foram</b>	

<b>encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011).....</b>	<b>30</b>
--	-----------

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 4.1 Número de amostras pesquisadas soronegativas para leptospirose distribuídas por município do Estado do Rio de Janeiro no período de 2008 a 2011.....21**

**Tabela 5.1 Distribuição das frequências dos dias de doença de casos suspeitos de leptospiroses, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011)..... 31**

**Tabela 5.2 Distribuição da frequência de sinais e sintomas dos casos suspeitos de leptospiroses, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011).....32**

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Saúde, a situação epidemiológica das doenças infecciosas no Brasil pode ser resumida em três grandes tendências quanto à sua incidência:

(i) Doenças transmissíveis infecciosas com tendência decrescente, como poliomielite, difteria, Doença de Chagas, hanseníase, entre outras.

(ii) Doenças infecciosas com quadro de persistência como, por exemplo, a malária, tuberculose, meningites, febre amarela, hepatites, esquistossomose, entre outras.

(iii) Doenças infecciosas emergentes e re-emergentes que incluem as doenças que foram introduzidas ou re-emergiram no Brasil durante as últimas duas décadas, destacando-se a AIDS, a síndrome pulmonar por hantavírus (SPH), dengue, cólera e leptospirose. (Tavares, W. e Marinho, L.A.C 2007).

A SPH e a leptospirose, especialmente na forma com manifestação pulmonar, fazem parte de um conjunto de doenças para quais as estratégias adotadas ainda não apresentaram os resultados esperados, cuja análise atual da situação aponta para a necessidade de sensibilização dos profissionais, assim como de uma organização mais eficiente e integrada dos serviços que compõem a complexa rede de assistência e de vigilância laboratorial associada à saúde pública. (MS/SVS 2010).

Como esperado, a problemática possivelmente envolve questões de diferentes origens. Uma delas está relacionada às modificações climáticas, comportamentais e sócio-econômicas, que nas últimas décadas têm determinado um maior contato entre o agente e seu hospedeiro. A outra está relacionada com o amplo espectro clínico das infecções por hantavírus e leptospirosas, assim como a similaridade clínica e epidemiológica destes agravos seja entre eles mesmos e com doenças infecciosas consideradas endêmicas no Brasil como dengue, malária, entre outros. Neste contexto, não raramente o diagnóstico diferencial destas doenças infecciosas passa a ser muito difícil e complexo. (MS/SVS 2009).

Apesar de aproximadamente 1600 casos de SPH terem sido notificados até o presente ano: dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) demonstram que apenas 14 dos 27 estados brasileiros são responsáveis por estas notificações. O estado do Rio de Janeiro se manifesta, até o momento, como uma zona silenciosa na notificação de casos de SPH.([www.portal.saude.gov.br](http://www.portal.saude.gov.br))

Na infecção por hantavírus, assim como em outras doenças infecciosas, a proporção de indivíduos infectados com sintomatologia (doença clínica) representa apenas a minoria, enquanto aqueles indivíduos assintomáticos (doença subclínica) representam uma proporção bem maior. O conceito do “iceberg” nos permite entender, que a ponta do “iceberg” e a



superfície abaixo demonstram a relação existente entre o número de indivíduos infectados com e sem sintomas clínicos. A partir deste conceito, espera-se que o número de indivíduos com sorologia positiva para hantavirus seja muito maior do que o número de casos diagnosticados com SPH (Campos et al. 2003). Diversos inquéritos sorológicos para hantavírus através da pesquisa de anticorpos da classe IgG com a utilização da proteína N recombinante do vírus Araraquara (ARQV) foram realizados em território nacional, evidenciando a circulação do vírus em todas as regiões do Brasil, na ausência de doença prévia associada (Hindrichsen et al 1993, Lima et al. 2011, Souza et al. 2011, Badra et al. 2012, Gimaque et al. 2012, Pereira et al. 2012, Limongi et al. 2013, Santos et al. 2013).

Considerando os dados apresentados acima, fica evidente que a vigilância sindrômica é uma estratégia da vigilância epidemiológica que, com base na análise de um conjunto de manifestações clínicas comuns a várias doenças, auxilia, oportunamente, na identificação etiológica de casos, contribuindo para a adoção precoce e precisa de medidas de controle. Esta vigilância das doenças infecciosas tem um papel fundamental na evolução da doença, uma vez que o diagnóstico precoce e a terapêutica direcionada modificam o desfecho do paciente (Medronho 2009). Assim, a avaliação clínica correta diante do quadro de síndrome febril aguda, com manifestação respiratória em paciente com fator de risco para leptospirose e hantaviruses, passa a ser um grande desafio para os profissionais da área da saúde uma vez que outras doenças durante os períodos de epidemias, como dengue e influenza, passam a ser negligenciadas.

## **Leptospirose**

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, com grande importância social e econômica. Nos últimos anos tem sido identificada como uma das doenças infecciosas emergentes de importância global (Barthi et al. 2003) e significativa complexidade (Vinetz et al 2005).

No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica e, eventualmente, epidêmica em períodos chuvosos, principalmente nos centros urbanos com grande aglomeração populacional associada a condições inadequadas de infra-estrutura sanitária e infestação de roedores. (Levett,2001). É uma doença de notificação compulsória, mas admite-se que o número de casos seja subestimado em decorrência das dificuldades de diagnóstico das formas mais brandas da leptospirose que podem ser confundidas com outras doenças febris agudas.

As leptospiras pertencem à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae* e gênero *Leptospira*. São bactérias que não têm categorização como bactérias Gram negativas nem

como Gram positivas e exibem movimentos característicos de rotação e translação. Tem morfologia espiral, longa e flexível, 0,1µm de largura por 6 a 20 µm de comprimento e apresentando em uma de suas extremidades uma forma de gancho. Apesar do crescimento *in vitro* ser fastidioso, podem ser cultivadas em meios líquidos, semi sólidos e sólidos, numa temperatura ideal de 28-30°C (Faine 1982).

Sob o ponto de vista taxonômico, a complexidade do gênero é histórica e científica. A classificação molecular não corresponde ao sistema de classificação sorológica. Com base na homologia DNA-DNA são hoje identificadas e nomeadas 20 espécies pertencentes ao gênero *Leptospira*. Novos métodos de identificação da bactéria com base na análise genômica tem ajudado na compreensão da epidemiologia da leptospirose (Levett 2007). A sorotipagem se baseia na estabilidade de antígenos expressos na superfície da bactéria e nas reações antígeno-anticorpo, determinadas no teste de aglutinação microscópica (MAT) com absorção cruzada. O termo sorotipo foi substituído pela designação sorovar, que é definido como a unidade taxonômica básica e é representada por uma cepa de referência (WHO, 2003). Atualmente, são reconhecidos mais de 200 sorovares de leptospirosas patogênicas e aproximadamente 60 de vida livre (Manson`s 2009).

## **Epidemiologia da Leptospirose**

O clima tropical é mais favorável à sobrevivência da bactéria no ambiente e, conseqüentemente, ao contato do homem com as fontes de infecção. A infecção humana resulta da exposição direta ou indireta à urina de animais infectados. A leptospirose ocorre após infecção por leptospirosas patogênicas. O principal reservatório é constituído pelos roedores sinantrópicos, das espécies *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato de telhado ou rato preto) e *Mus musculus* (camundongo ou catita). As situações de exposição ao risco podem estar ligadas a atividades ocupacionais, recreativas ou esportivas. O perfil do paciente é o indivíduo adulto do sexo masculino, na faixa etária de 20-45 anos, residente em área urbana, de ocupação ou profissão variada e que relata inundações e/ou presença de roedores peridomiciliares ou no local de trabalho (Pereira & Andrade 1988;1990).

O impacto das epidemias urbanas motivou as primeiras investigações epidemiológicas sistematizadas, baseadas em inquéritos sorológicos e bacteriológicos, que comprovaram a circulação da bactéria em animais portadores e taxas de prevalência de anticorpos em grupos populacionais expostos ao risco contribuindo, conseqüentemente, para uma grande proporção dos casos notificados e/ou confirmados no país (Ko et al. 1999, Kupek et al. 2000, Romero et al. 2003). Apesar de ser considerada uma doença emergente, as séries históricas mais

recentes não evidenciam, com clareza, a tendência de aumento de incidência ou no número de casos (Gouveia et al 2008, Coura 2013).

## **Patogenia da Leptospirose**

A patogenia da leptospirose compreende uma sequência de eventos comprovados e potenciais que envolvem rápida invasão tissular pela bactéria com alterações fisiopatológicas em diversos órgãos e sistemas, a partir da resposta imune adaptativa que culmina com a eliminação do agente etiológico dos tecidos e líquidos orgânicos. Diversos fatores de virulência conhecidos estão relacionados com as propriedades de adesão, invasão, colonização e toxicidade de leptospiras (Gonçalves-de-Albuquerque et al. 2012).

Em um grande surto epidêmico ocorrido no estado do Rio de Janeiro, em 1988, foram identificados os primeiros casos graves marcados pela presença de hemorragia pulmonar e insuficiência respiratória, como manifestações mais proeminentes e fatais da leptospirose (Gonçalves et al. 1992). O comprometimento pulmonar pode estar presente tanto na forma anictérica quanto na ictérica da leptospirose, variando entre 20-70%, na qual clinicamente é possível verificar, conseqüentemente, tosse, dispnéia, dor torácica, hemoptise e, em casos mais graves, insuficiência respiratória (Marotto et al. 1999; Gulati et al 2012).

Caracterizada por uma hemorragia pulmonar intra-alveolar, observa-se espessamento dos septos alveolares, com aumento no número de células mononucleares e escassez de leptospiras típicas nos locais adjacentes às lesões tissulares no pulmão tanto em humanos quanto em modelos experimentais (Nicodemo et al. 1997, Pereira et al. 1998, Nally et al. 2004, Croda et al. 2010, Brito et al. 2013, Gonçalves-de-Albuquerque et al. 2014).

## **Crítérios para definição de caso de forma pulmonar da leptospirose (FPL)**

Há uma tendência recente a se caracterizar uma nova forma de evolução clínica da leptospirose, a forma pulmonar grave da leptospirose (FPGL). Todavia, ainda há dúvidas se constitui, de fato, uma individualidade clínica ou se representa apenas uma complicação pulmonar específica que ocorre na evolução da forma ictérica ou leptospirose grave (Coura 2013).

Segundo alguns autores, o comprometimento pulmonar na FPGL aumenta a taxa de letalidade para 60-70%. A evolução é rápida e o óbito pode acontecer em menos de 72 horas, após início dos sintomas respiratórios, muitas vezes sem que o paciente tenha desenvolvido icterícia ou insuficiência renal (Trevejo et al.1995, Silva et al. 2002). Tipicamente, os

sintomas respiratórios surgem entre o quarto e sexto dia, com um quadro inicial considerado leve ou moderado que, subitamente, evolui para dispneia e insuficiência respiratória acompanhada de hemoptise franca e intensa. O diagnóstico se estabelece, conjuntamente, pela presença de alterações radiológicas, como condensações alveolares, segmentares, em lobos inferiores e periféricos, hemoptise e hipoxemia (Silva et al. 2002, Dolhnikoff et al. 2007, Marchiori et al 2011).

A fatalidade é na maioria das vezes inevitável, porém relatos de casos sugerem que o diagnóstico e intervenções precoces podem melhorar o prognóstico da FPGL (Silva et al. 2002).

## **Manifestações Clínicas**

É uma doença infecciosa sistêmica febril aguda, potencialmente grave, que apresenta manifestações clínicas muito variáveis. Na maioria dos casos os pacientes têm evolução aguda e autolimitada, com sintomatologia inespecífica semelhante “síndrome gripal”, não evoluindo com icterícia ou outras morbidades. Aproximadamente 90% dos casos sintomáticos apresentam a forma mais branda e anictérica da doença e 10-15% dos casos evoluem para a forma grave com icterícia rubínica, insuficiência renal aguda e diátese hemorrágica, o que caracteriza a síndrome de Weil (WHO 2003).

O período médio de incubação é de sete a 14 dias, podendo variar de dois a 30 dias. Tipicamente apresenta um caráter bifásico, com uma primeira fase denominada também de fase de bacteremia, que corresponde à disseminação das bactérias na corrente sanguínea e nos tecidos que perdura por 4 a 7 dias. A segunda fase, ou fase imune, inicia-se com o aparecimento de anticorpos e dura aproximadamente 10 a 30 dias e as leptospiras são eliminadas na urina de modo intermitente (Levett 2001). A Figura 1.1 demonstra a natureza bifásica da leptospirose.

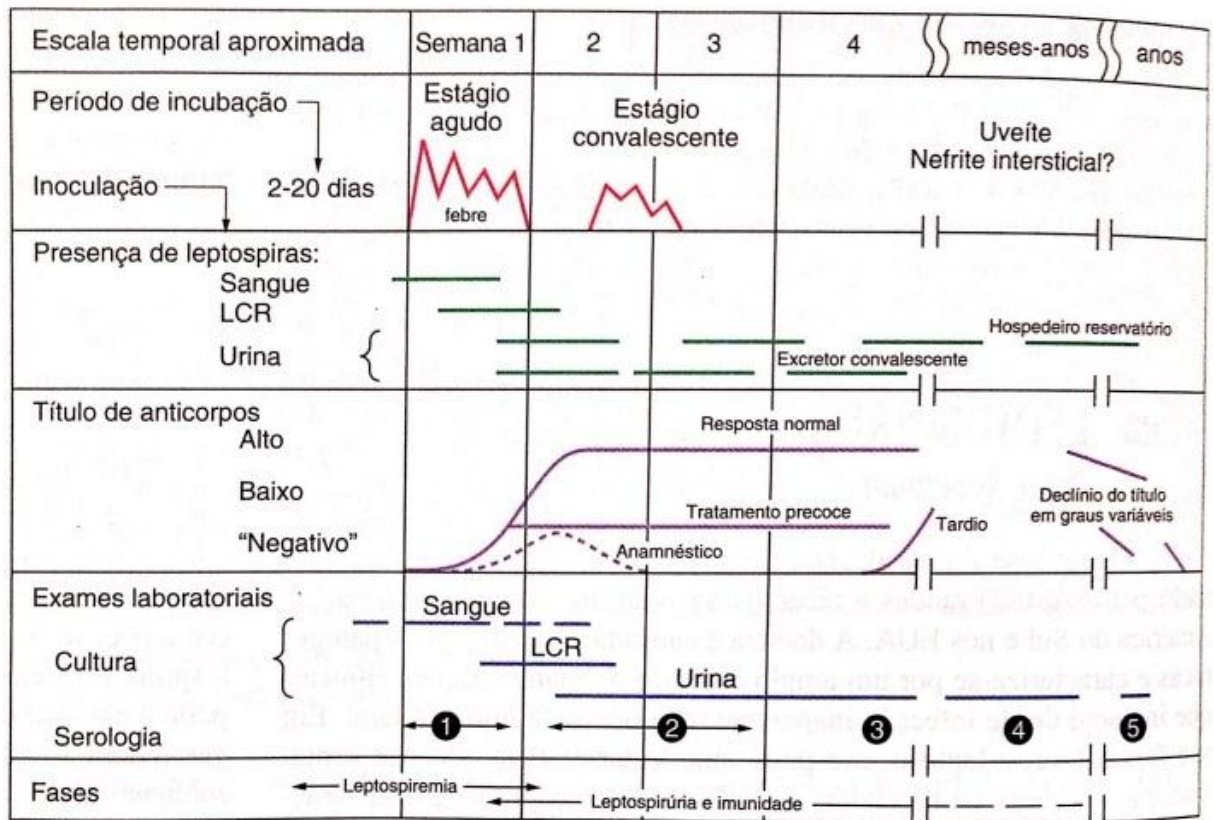


Figura 1.1 Natureza bifásica da leptospirose (Levett 2001)

Mais recentemente, a literatura tem apresentado relatos de casos de leptospirose com comprometimento pulmonar que pode se manifestar como uma pneumonia intersticial sem critérios de gravidade, ou em casos mais graves, como síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA) (Brasil/MS 2009) Curiosamente esta forma clínica da leptospirose, FPGL, geralmente não cursa com alterações nas funções renal ou hepática. Entre doenças infecciosas que evoluem com quadro respiratório, a FPGL pode ser confundida com a hantavirose, uma doença que também está relacionada à exposição a roedores. A incidência de FPGL tem aumentado e tem sido considerada a principal causa de óbito por leptospirose no Brasil (Dolhnikoff et al. 2007, Cobrum 2012).

## Diagnóstico Clínico Diferencial e Laboratorial

A importância de exclusão de algumas doenças infecciosas no diagnóstico diferencial depende da incidência das mesmas na região. Dentre os agravos infecciosos, no caso de leptospirose anictérica o diagnóstico diferencial deve ser feito poliomiosite, coxsakiose, dengue, influenza (gripe), meningoencefalite a liquor claro, infecção urinária, piomiosite tropical. No caso de leptospirose ictérica, deve ser feito com hepatites agudas virais, febre

amarela, dengue, sepse, malária por *Plasmodium falciparum*, colecistite aguda, febre tifoide e hantavirose. No caso da forma pulmonar grave de leptospirose, devemos diferenciar de pneumonias atípicas e típicas graves e a Síndrome Pulmonar por Hantavírus. (Tavares, W. e Marinho, L.A.C 2007).

A confirmação diagnóstica deve ser realizada por meio de testes específicos, todavia, alguns parâmetros observados nas análises laboratoriais inespecíficas e radiológicas convencionais auxiliam no raciocínio diagnóstico (Brasil/MS 2009).

A confirmação laboratorial do caso suspeito é baseada na demonstração da presença de leptospiros, fragmentos de DNA ou detecção de anticorpos específicos. Assim a coleta de amostras deve ser realizada de acordo com a probabilidade de detecção do agente em correlação com a fase da doença (Levett 2001).

O cultivo de leptospiros a partir do sangue ou liquor e a reação da polimerase em cadeia (*polymerase chain reaction* – PCR) são positivos na primeira semana de doença, na fase aguda, denominada de bacteremia. Nesta fase os testes sorológicos podem ser negativos ou apresentarem baixos títulos. A partir da segunda semana, as leptospiros e fragmentos de DNA são encontrados na urina e os testes sorológicos podem ser positivos. Métodos de biologia molecular tem auxiliado no diagnóstico precoce (Balassiano et al, 2012). Imuno-histoquímica e testes baseados em PCR são os métodos mais utilizados para confirmação de casos *post mortem* (MS/FUNASA 2002, WHO 2003).

O diagnóstico da leptospirose é realizado rotineiramente por métodos sorológicos, sendo ELISA-IgM e aglutinação microscópica (*microscopic agglutination test*-MAT) os testes mais utilizados. Os testes de ELISA-IgM são mais simples e estão disponíveis no mercado. O MAT é um teste quantitativo considerado de alta complexidade porque envolve manutenção de cepas. Devido às características de sensibilidade e especificidade o MAT é o padrão-ouro recomendado por especialistas nas diversas publicações da OMS. São utilizados painéis contendo diversas cepas de referência, com o propósito de propiciar a detecção de infecções causadas por sorovares incomuns ou não descritos na região (WHO 2003).

A interpretação dos resultados de testes sorológicos deve ser sempre baseada no exame de amostras sequenciais. O pareamento é importante para detectar soroconversão (resultado negativo na primeira amostra e reagente na segunda ou variação de quatro vezes nos títulos entre duas amostras em testes quantitativos). Normalmente, os anticorpos séricos surgem na leptospirose a partir do sétimo dia de evolução da doença, sendo um exame pouco sensível na fase aguda. E muitos pacientes com a forma pulmonar evoluem para óbito sem diagnóstico sorológico definitivo. As amostras devem ser coletadas com intervalo de 10 a 14 dias e a sorologia negativa na fase inicial não exclui a hipótese diagnóstica (Levett 2001).

A leptospirose, principalmente na forma pulmonar se manifesta como uma síndrome infecciosa grave, denominada Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica secundária a infecção por *Leptospira* spp. Tal conjunto de sinais e sintomas relacionados a um evento infeccioso pode ser considerado sepse e trata-se de uma urgência infecciosa. Por isso, biomarcadores tem sido utilizados na fase inicial para contribuir na avaliação diagnóstica e prognóstica. Dentre outros, podemos citar a procalcitonina, está entre os marcadores de sepse mais promissores, capazes de complementar os sinais clínicos e parâmetros laboratoriais de rotina sugestivos de infecção grave (Sudhir et al 2011, Chirathaworn et al 2014).

## **Tratamento e Medidas Preventivas**

A conduta terapêutica depende da gravidade do caso. Pacientes com manifestações mais brandas podem ser tratados sintomaticamente, mas devem ser observados quanto aos sinais de gravidade. Casos mais graves precisam de internação hospitalar e terapia de suporte intensiva visando ao equilíbrio hidroeletrólítico e ácido-básico. Recomenda-se o tratamento com antimicrobianos nas formas graves da doença até o quinto dia, embora haja controvérsias quanto à eficácia do tratamento instituído após os quatro primeiros dias de doença (Watt et al. 1988, Katz et al. 2001, Guidugli et al 2000, Panaphut et al. 2003). Recomenda-se a administração de penicilina G cristalina endovenosa ou ampicilina por um período de cinco a sete dias. Estudos demonstraram que a ceftriaxona é semelhante a penicilina na eficácia de tratamento (Panaphut et al 2003). A doxiciclina é recomendada para o tratamento profilático e nos casos leves pode ser usada assim como a amoxicilina (Guidugli et al. 2000, Brasil/MS 2009, Brett-Major et al 2009). A ocorrência da reação de Jarisch-Herxheimer é rara e não deve inibir o uso de antibióticos. Mesmo com tratamento adequado, alguns pacientes podem evoluir com complicações graves (Friedland et al .1991, Guerrier et al 2013).

A maioria dos pacientes recupera-se completamente e alguns fatores prognósticos relacionados à mortalidade já foram descritos, tais como dispneia, oligúria, infiltrado alveolar, anormalidade cardíacas de repolarização e leucocitose (Dupont et al 1997).

As medidas de prevenção e de controle devem ser direcionadas não somente aos reservatórios, mas, também, à melhoria das condições de proteção dos trabalhadores expostos, à melhoria das condições higienico-sanitárias da população e às medidas corretivas no meio ambiente, com o objetivo de reduzir a capacidade desses fatores como suporte para instalação e proliferação de roedores (MS/SVS 2010).

## Hantavíruses

As infecções causadas por hantavírus apresentam distribuição mundial e constituem um importante problema de saúde pública em muitas áreas da Ásia e Europa. Nas Américas, estão associadas com uma nova zoonose, a Síndrome Pulmonar por Hantavírus (SPH), um protótipo do grupo de doenças infecciosas consideradas emergentes. Esta nova doença foi descrita, inicialmente em 1993, na região sudoeste dos Estados Unidos (EUA) após uma epidemia inesperada de pneumopatia infecciosa grave (MMWR 1994), Nolte et al. 1995, Elliot et al. 1994) cujo agente etiológico foi denominado hantavírus Sin Nombre. A partir de então, novos hantavírus e casos da SPH têm sido continuamente descritos em outras regiões do continente americano como Choclo no Panamá, Andes na Argentina, Rio Mamoré na Bolívia e Laguna Negra no Paraguai (Levis et al. 1995;1998, Johnson et al. 1997, Nolte et al.,1995, Figueiredo et al. 2014). A figura 1.2 mostra a distribuição dos hantavírus e seu roedor-reservatório.



Figura 1.2 Mapa da América do Sul evidenciando distribuição dos hantavírus causadores de SPH e seu roedor-reservatório (Figueiredo LTM et al Virus Research 2014)

No Brasil, também a primeira descrição ocorreu em 1993, quando, foi possível identificar os primeiros três casos - somente um sobreviveu - em Juquitiba, estado de São Paulo. O primeiro hantavírus, no território brasileiro, denominado vírus Juquitiba, foi



identificado posteriormente não somente em amostras humanas, mas também em amostra do roedor silvestre reservatório *Oligoryzomys nigripes* (Silva VM et al 1997 Johson et al 1999). Em sequência, foram identificados outros hantavírus causadores da SPH no Brasil como Araraquara, Anajatuba, Castelo dos Sonhos, Laguna Negra-like e Rio Mamore associados, respectivamente, com roedores das espécies *Necromys lasiurus*, *Oligoryzomys fornesi*, *Oligoryzomys utiaritensis*, *Callomys callidus* e *Oligoryzomys microtis* (Suzuki et al. 2004, Rosa et al. 2005, Oliveira et al. 2009, Firth et al. 2012, Guterres et al.,2013). Em adição, novos hantavirus considerados não patogênicos - Rio Mearim e Jabora - têm sido identificados, até a presente data, apenas em espécies de roedores silvestres; Rio Mearim, em roedor *Holochilus sciureus* e Jabora, em *Akodon spp* (Travassos et al 2010, Oliveira et al. 2011)

Constituído por mais de 80 vírus geneticamente relacionados e amplamente dispersos no Mundo, os hantavírus são vírus esféricos, envelopados, pertencentes ao gênero *Hantavirus*, família *Bunyaviridae*, transmitidos ao homem, principalmente, através da inalação de partículas virais presentes em aerossóis formados a partir de secreções e excreções de roedores. Os hantavírus são vírus de fita simples RNA trissegmentados - um segmento grande (L), de aproximadamente 6500 nucleotídeos que codifica uma RNA polimerase viral, um segmento médio (M), com 3600 a 3800 nucleotídeos que codifica as glicoproteínas G1 e G2 do envelope viral e o segmento pequeno(S), com cerca de 1700 a 2100 nucleotídeos que codifica a proteína N do nucleocapsídeo, de polaridade negativa, medindo 80-120 nm (Gonzales-Scarano F et al 1990, Schmaljohn et al. 1997, Nichol 2001).

## **Epidemiologia da SPH**

O mecanismo habitual de infecção humana ocorre a partir do íntimo contato do homem com roedores silvestres, pela inalação de aerossóis que são formados a partir de urina, fezes e saliva de roedores infectados (Brasil/MS 2009). Um destaque deve ser feito para a possibilidade de transmissão inter-humana, como relatado em um surto causado no Sul da Argentina, pelo vírus Andes (Wells et al 1997). A figura 1.3 demonstra o ciclo de transmissão do hantavírus.

Roedores silvestres são os principais reservatórios de hantavírus, no Hemisfério Sul são pertencentes à subfamília Sigmodontinae. Os hantavirus têm sua evolução intimamente relacionada com a de seus animais reservatórios, evento que determina a espécie-especificidade entre a variante viral e a espécie de roedor (Spiropoulou et al. 1994, Plyusnin et

al. 1996). No território nacional, dentre as diferentes espécies de roedores envolvidos na transmissão, *Oligoryzomys nigripes* se encontra distribuído em quatro áreas endêmicas (São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e em áreas sem ocorrência de casos humanos (Rio de Janeiro e Espírito Santo). A espécie *O. nigripes* habita florestas primárias e secundárias na Mata Atlântica e é uma das principais espécies oportunistas que se instala em áreas rurais (D`Andrea PS 2007).

Dados mais recentes do Ministério da Saúde desde os primeiros registros em 1993, até o ultimo ano de 2013, mostrou que foram notificados mais de 1.600 casos de SPH, com 40% de óbitos, distribuídos entre 14 estados com a maioria das notificações nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná e São Paulo. No Rio de Janeiro, embora até a presente data não tenha sido notificado qualquer caso de SPH, existe, além da evidência sorológica de circulação em população humana, a identificação do Jucituba hantavírus (JUQV) em roedor silvestre reservatório *O. nigripes*, tanto na região serrana quanto na região sul fluminense (Lemos ERS Comunicação Pessoal, Oliveira et al. 2009). Em relação ao estudo em humanos, em 2003, 9,3% das amostras de casos suspeitos de leptospirose apresentaram reatividade sorológica para hantavírus (Lemos et al. 2003) e, mais recentemente, em um estudo realizado por Lamas e colaboradores foi possível identificar 1,6% de reatividade de anticorpos para hantavírus em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) na região de Jacarepaguá, Rio de Janeiro (Lamas et al. 2013)

A primeira evidência sorológica em humanos foi reportada durante uma epidemia de leptospirose em Recife em 1990 (Hindrichsen et al. 1993) e partir daí diversos inquéritos sorológicos foram realizados.

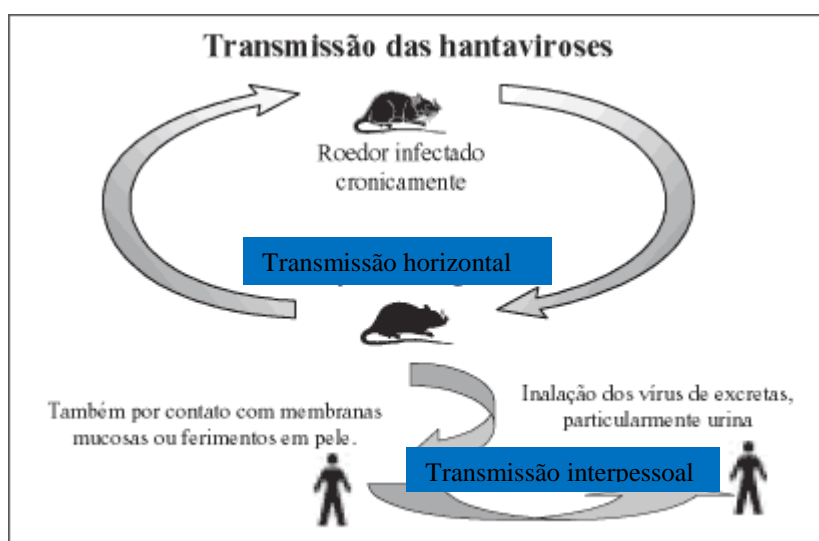


Figura 1.3 Transmissão do hantavírus (adaptado Pincelli 2003)

## **Patogênese da SPH**

Apesar do conhecimento da patogênese da SPH ainda ser incipiente, estudos demonstram que os hantavirus americanos utilizam  $\beta 3$  integrinas como receptores para infectar as células, agindo como aderências juncionais que unem células endoteliais e integram a barreira alvéolo-capilar (Gravilovskaya et al.1998). Desta forma, ocorre, o rompimento da barreira das células endoteliais ao fluido vascular com consequente aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de plasma para o espaço intersticial (Gravilovskaya et al. 2012, Gorbunova et al. 2010, Shrivastava-Ranjan et al. 2010).

Após a invasão das células endoteliais e de macrófagos, ocorre replicação do hantavírus com disseminação das partículas virais que podem ser encontradas em tecidos pulmonares, renais, cardíacos, hepáticos e esplênico, entre outros (Zaki et al. 1995). Após infecção ocorre intensa resposta inflamatória ao vírus, com grande quantidade de células produtoras de citocinas, com produção de interleucina IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , TNF- $\beta$  e interferon  $-\gamma$ . Adicionalmente, linfócitos TCD4 e TCD8 têm sido isolados de tecido pulmonar de necropsias de pacientes com SPH. (Ennis et al. 1997, Mori et al. 1999, Simmons & Riley 2002). Aspectos adicionais da patogênese da SPH demonstraram dano ao miocárdio com miocardite típica que poderia ser responsável pela depressão miocárdica e choque cardiogênico, evento que levou a denominação desta hantavirose também como a síndrome cardio-pulmonar por hantavírus (SCPH) (Saggiaro et al. 2007).

## **Critérios para Definição de Caso de SPH**

A definição de caso suspeito de SPH consiste em uma doença febril aguda com sinais de insuficiência respiratória aguda de etiologia não definida ou óbito por insuficiência respiratória aguda, em um contexto epidemiológico para exposição ao hantavírus, na primeira semana de doença. A doença humana depende do íntimo contato com roedores, como ocorre em áreas rurais com alta densidade desses animais, como paióis de fazenda, galpões de armazenamento de grãos, porões ou sótãos de casas velhas ou abandonadas, durante campanhas militares ou em áreas periurbanas com grande aglomeração populacional, construídas ao lado de matas ou outros ambientes silvestres.

Trata-se de uma doença febril aguda com histórico de exposição a uma situação de risco ocorrida nos últimos 60 dias que antecedem o início dos sintomas. Entende-se por risco: (a) exposições a atividades de risco para a infecção por hantavirus; ou (b) existência de população de roedores silvestres e/ou condições ambientais favoráveis ao seu estabelecimento (Brasil/ MS2009).

As hantavirose têm sido também consideradas doenças de caráter profissional, sendo determinados grupos mais acometidos por esta zoonose, tais como fazendeiros, engenheiros agrônomos, veterinários, geólogos, biólogos. No Brasil, aproximadamente 50% das infecções ocorreram em indivíduos ligados às atividades agropecuárias (El-Khoury M).

## **Manifestações Clínicas**

O quadro clínico da SPH pode variar desde forma assintomática até um quadro semelhante a gripe por *Influenza*, com febre, mialgia, sintomas gastrointestinais como náuseas, vômitos e diarreia, cefaleia e dor lombar e abdominal. Após um período de incubação médio de 15 dias, o quadro pode evoluir rapidamente para a insuficiência respiratória (Young et al, 2000). A presença de tosse seca leva a suspeita de evolução do quadro inicial para fase clínica mais grave, denominada fase cardiopulmonar. Durante a fase cardiorrespiratória observamos tosse seca, acompanhada de taquicardia, taquidispneia e hipoxemia, decorrente da infiltração de líquido e proteínas no interstício e nos alvéolos pulmonares. Essas manifestações podem ser seguidas por rápida evolução para edema pulmonar não cardiogênico, hipotensão arterial e consequente choque circulatório, com índice cardíaco baixo e uma resistência vascular sistêmica aumentada. O óbito pode ocorrer em poucas horas ou entre 4 a 6 dias, após o início da falência respiratória, mesmo em indivíduos submetidos ao suporte ventilatório precocemente (Ketai et al, 1994, Nichol et al 2001). O prognóstico é ruim e a taxa de letalidade pode alcançar 40%. Quando o reconhecimento da síndrome é realizado de forma precoce e a terapia de suporte adequadamente conduzida, com base na necessidade de drogas inotrópicas e cuidado na reposição hídrica, a taxa de sobrevivência tem alcançado percentuais de 70-80% (de Rosa et al, 2012).

## **Diagnóstico Clínico Diferencial e Laboratorial**

A SPH deve ser diferenciada de numerosas outras doenças infecciosas agudas que, frequentemente, ocorrem, de forma endêmica, em vários países americanos. Dentre as

doenças que devem ser incluídas no diagnóstico diferencial da SPH podemos citar: influenza, pneumonia pneumocócica, pneumonia aspirativa, legionelose, pneumonia estafilocócica, pneumonia por Mycoplasma, choque séptico, peste pulmonar, antraz respiratório, riquetsioses, forma pulmonar da leptospirose, síndrome do choque do dengue, malária grave com edema agudo de pulmão, histoplasmose aguda, febre Q e pneumocistose. Dentre as doenças não-infecciosas englobamos a Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (SARA) de diversas etiologias, Síndrome de Goodpasture, doença cardíaca com edema agudo de pulmão, estenose mitral, infarto agudo do miocárdio, doenças do colágeno, pneumonite eosinofílica, pneumonite por hipersensibilidade aguda, carcinoma bronquioloalveolar (Tavares, W. e Marinho, L.A.C 2005). Cabe ressaltar que os sintomas respiratórios, tais como tosse, coriza, dispnéia entre outros, surgem após três dias de sintomatologia. Na fase em que o paciente se encontra com insuficiência respiratória e choque, fazem parte do diagnóstico diferencial a sepse, estafilococcia grave, leptospirose, pneumonias atípicas e pneumocistose. (Figueiredo et al, 2000).

Apesar de inespecíficas, as alterações laboratoriais observadas na hantavirose - leucocitose com desvio para esquerda, presença de mielócitos, imunoblastos e linfopenia relativa com linfócitos atípicos, trombocitopenia com contagem de plaquetas inferior a  $100000/\text{mm}^3$ , hemoconcentração (hematócrito acima de 45%), elevação de enzimas hepáticas e LDH, discreto aumento de uréia e creatininas séricas -, se associadas às informações radiológicas, facilitam o raciocínio em conjunto com informações clínico-epidemiológicas.

Uma alteração laboratorial muito frequente na hantavirose é a presença de linfócitos atípicos, diferentemente da leptospirose, uma doença bacteriana, em que a alteração laboratorial mais comumente encontrada é leucocitose com neutrofilia. Entretanto, recentemente, um grupo de pesquisadores relatou numa série de casos de leptospirose diagnosticados laboratorialmente no Laboratório de Referência Nacional em Leptospirose (LRNL) onde observaram em alguns casos linfócitos atípicos (Damasco et al. 2011).

A análise radiológica dos pacientes com SPH inicialmente pode estar normal, e, em horas, pode evoluir para infiltrado intersticial difuso, perda da nitidez hilar por congestão e infiltrado peribrônquico, presença de linhas B de Kerley, além de derrame pleural. Com a progressão da doença, ocorre comprometimento bilateral atingindo às vezes todo campo pulmonar que regride, quando a evolução é favorável, com a recuperação completa do paciente (Ketai et al. 1994, Boroja et al. 2002). A tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) dos pulmões não mostra alterações específicas e é possível verificar

infiltrado do septo interlobular, opacificação em vidro fosco e ocasionalmente, opacidade nodular (Gonçalves et al. 2010).

O diagnóstico definitivo de infecção por hantavírus é realizado a partir das análises laboratoriais com base na detecção indireta de anticorpos anti-hantavírus nos testes sorológicos e a detecção direta utilizando técnicas moleculares – para identificação do RNA viral, além do isolamento viral.

Dentre as técnicas sorológicas podem ser utilizadas, a imunofluorescência indireta, teste imunoenzimático (Elisa) e teste de neutralização em placa. Atualmente, a técnica Elisa para captura de IgM (Mac-Elisa) e para detecção de IgG é utilizada, preferencialmente, no esclarecimento de casos clínicos e/ou em investigações sorológicas, embora a presença de sororeatividade não permita distinguir diferentes genótipos. Assim, devido à reação cruzada entre os genótipos de hantavírus, é possível a utilização do Elisa com antígenos recombinantes, por exemplo, Sin Nombre (EUA) e Andes (Argentina), em áreas de circulação dos genótipos Jucituba, Castelo dos Sonhos e Araraquara, no Brasil. Desde 2007, dois *kits* diagnósticos produzidos a partir do antígeno recombinante de hantavírus brasileiros têm sido disponibilizados, tanto para a detecção de imunoglobulina da classe IgM quanto IgG, pelo teste imunoenzimático, além de um teste de *immunoblotting* com base na proteína N (Raboni et al 2007; Figueiredo et al 2009)

Em relação à detecção direta do hantavírus, embora possa ser cultivado em linhagens celulares como Vero E-6 e células primárias de pulmão de rato, o isolamento não se mostra factível na prática clínica (Schmaljohn e Hooper, 2001). A técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), após a transcrição reversa do RNA viral (RT-PCR) de amostras de sangue e de tecido, tem se mostrado uma técnica sensível, principalmente durante a fase aguda da doença, nos primeiros sete dias. Além da importância da técnica molecular na caracterização do hantavírus causador da SPH, a necessidade avaliação da diversidade genética entre os hantavírus, tanto em amostras humanas quanto de roedores, reforçam a recomendação da PCR em tempo real (RT PCR) como instrumento diagnóstico que deve ser realizado sempre que possível (Morelli et al 2004).

A técnica de imuno-histoquímica também pode ser utilizada, sendo particularmente mais apropriada em um diagnóstico retrospectivo a partir de material de necropsia de casos fatais (Zaki et al 1995, Sestaro, 1999)

No Brasil, o exame complementar mais comumente utilizado para o diagnóstico da SPH é o teste sorológico de ELISA, realizado de modo indireto para detecção de anticorpos IgG ou por método de captura, para detecção de anticorpos IgM.

Estudos sobre a cinética de anticorpos, como MacNeil et al (2010), demonstram que anticorpos específicos da classe IgM aparecem precocemente durante o curso clínico da SPH e os da classe IgG mais tardiamente.

## **Tratamento e Medidas de Prevenção**

Pacientes com quadro clínico compatível com a SPH devem ser admitidos imediatamente em centros de terapia intensiva (CTI), aonde o paciente possa ser submetido a cuidados de monitoramento cardiorrespiratório, reposição adequada de volemia e de eletrólitos, correção dos distúrbios metabólicos, além da administração de medicações inotrópicas e oxigenoterapia.

Em alguns serviços que atendem pacientes com SPH na América do Sul (Brasil, Argentina, Chile), os corticosteroides têm sido administrados empirica e precocemente, com resultados interessantes, embora não haja consenso quanto ao seu uso e nem estudo randomizado duplo-cego para avaliar sua eficácia, mostrando a necessidade de estudos sobre este assunto (Butler e Peters 1994, Moolenaar et al 1995, Vial et al 2013).

A utilização de ribavirina em casos de SPH tem sido estudada, quando instituída precocemente, tem se mostrado eficaz *in vitro* contra os hantavírus (Chapman et al 2002, Mertz et al, 2006). Embora não exista tratamento específico, as medidas de suporte clínico após o reconhecimento precoce da doença melhoram sensivelmente o prognóstico da SPH (da Rosa et al 2012).

Em relação a biossegurança, recomenda-se, sempre que possível, que o paciente seja internado em condições de isolamento com equipamentos de proteção individual (EPI) e respiratório para aerossóis (mascara N 95). Embora não haja relato de transmissão inter-humana no Brasil, Hardestam et al 2008 e 2009 mostraram que tal forma de transmissão com o hantavirus Andes, pode ocorrer pelo contato com a saliva ou sexual (Martinez 2005 et al).

Como a ocorrência de casos humanos está relacionada com o contato com roedores silvestres e/ou excretas, as medidas de controle devem ser direcionadas para os ambientes potencialmente contaminados, com ênfase em habitações que possam servir de abrigos ou ninhos de roedores, que armazenem produtos agrícolas e/ou que tenham permanecido fechadas. Não existe, até o momento, uma vacina efetiva contra os hantavírus causadores

da SPH, apesar de algumas pesquisas em andamento (Hooper 2013, Maes et al 2009 , Schmaliohn, 2009).

## 2. JUSTIFICATIVA

Dados epidemiológicos do Ministério da Saúde, durante o período de 2008-2011, comprovam 16.249 casos de leptospirose no Brasil, com 1.291 notificados no estado do Rio de Janeiro. Neste mesmo período, embora mais de 550 casos da SPH tenham sido notificados no Brasil, não houve nenhum caso notificado no estado do Rio de Janeiro. Devido à sua localização de fronteira com estados de São Paulo e de Minas Gerais, estados com elevada incidência da SPH, uma vigilância constante no território fluminense passa a ser imprescindível, em especial, quando há a presença de casos febris que se enquadram na definição de caso sem etiologia identificada e casos fatais sem esclarecimento diagnóstico com quadro respiratório associado.

Apesar da inexistência de casos confirmados da SPH no território fluminense, estudos têm demonstrado, além da evidência sorológica da circulação de hantavírus patogênico em roedores da espécie *Oligoryzomys nigripes* no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (Pereira et al. 2005, Silva et al. 2005), também a detecção e caracterização genética de hantavírus Juquitiba – like em *Oligoryzomys nigripes* no município de Teresópolis-RJ (Oliveira et al. 2011). Em adição, evidência sorológica em humanos no município do Rio de Janeiro já foi relatada por Lemos e colaboradores em amostras de pacientes com suspeita, mas descartados de leptospirose, cujo teste sorológico detectou anticorpos anti-hantavírus da classe IgG em 9,3% (Lemos et al 2003) e na região de Jacarepaguá, onde 1,6% dos indivíduos HIV positivos apresentaram anticorpos anti- hantavírus (Lamas 2006).

Neste contexto e considerando a necessidade de mais informações sobre a possível ocorrência de hantavírus causando infecção humana assim como o diagnóstico diferencial com duas doenças clínicas e epidemiologicamente semelhantes, este estudo retrospectivo tem como proposta avaliar a frequência de anticorpos anti-hantavírus em amostras negativas de casos suspeitos de leptospirose com manifestação respiratória, procedentes dos municípios das Regiões Serrana, Centro Sul Fluminense e Médio Paraíba do Estado do Rio de Janeiro, onde roedores infectados foram previamente identificados. Assim, além de contribuir para o diagnóstico diferencial em doenças infecciosas febris agudas com manifestação respiratória no território fluminense, a partir da análise do banco de dados do Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde para Leptospirose do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,



no período de 2008 a 2011, será possível gerar dados e informações inéditas sobre aspectos clínicos e epidemiológicos dos casos suspeitos de leptospirose cujo diagnóstico permanece sem etiologia definida.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Investigar a presença de anticorpos anti-hantavirus nas amostras de pacientes suspeitos, mas não confirmados sorologicamente para leptospirose, oriundas dos municípios das Regiões Serrana, Médio Paraíba e Centro Sul Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, entre 2008 a 2011.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar as características clínicas e epidemiológicas dos casos suspeitos de leptospirose com resultado negativo para esta zoonose, durante o período de 2008 a 2011, através dos dados da ficha epidemiológica do Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde para Leptospirose do Instituto Oswaldo Cruz.
- Investigar presença de anticorpos anti-hantavírus, utilizando teste imunoensaio, em amostras de pacientes com suspeita inicial de leptospirose que apresentaram febre e manifestação respiratória no decorrer do curso clínico.
- Realizar análise molecular - RT-PCR - nas amostras sororreativas em casos com menos de três dias de evolução de doença.
- Contribuir para o raciocínio de diagnóstico diferencial sindrômico das duas zoonoses e propor um fluxo de vigilância epidemiológica e sindrômica nos casos de doença febril aguda com manifestação respiratória no estado do Rio de Janeiro (anexo 2).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Desenho e Local de Estudo**

Trata-se de um estudo retrospectivo, com análise secundária de dados, utilizando o banco de dados do Laboratório de Referência Nacional para Leptospirose e análise laboratorial das amostras de sangue no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Na primeira etapa do estudo, foi realizada a avaliação do banco de dados e das amostras de sangue que foram encaminhadas ao Laboratório de Referência Nacional para Leptospiroses/FIOCRUZ durante o período de 2008 a 2011. Somente amostras de sangue de pacientes internados em unidades hospitalares das regiões Serrana, Centro Sul Fluminense, Médio Paraíba e de alguns municípios das regiões do Noroeste Fluminense e da região da Costa Verde do Estado do Rio de Janeiro, foram incluídos no estudo. Esta seleção foi realizada considerando a confirmação de roedor infectado por hantavírus Juquitiba na região serrana e pela proximidade das outras regiões com os estados de Minas Gerais e de São Paulo, onde casos de SPH ocorrem frequentemente desde 1993. Todas as amostras de sangue eram de casos suspeitos de leptospirose com manifestação respiratória, cujo diagnóstico foi descartado utilizando o teste de microaglutinação. Subsequentemente, considerando a identificação de indivíduos HIV reativos com anticorpos anti-hantavírus em Jacarepaguá amostras provenientes do município do Rio de Janeiro e da região metropolitana foram também incluídas para análise. A figura 4.1 evidencia as regiões do Estado do Rio de Janeiro de onde as amostras foram enviadas.

## 4.2. Seleção e caracterização da população de estudo

As fichas com os dados clínicos e epidemiológicos disponíveis foram identificadas com números específicos, em correspondência com o número contido no criotubo com a amostra do paciente. Como critérios de inclusão foram considerados:

1) amostras negativas de pacientes que apresentavam febre e alteração respiratória com teste sorológico negativo para leptospirose

2) amostras de pacientes procedentes das macrorregiões Serrana e do Médio Paraíba, onde se localizam, respectivamente, os municípios de Teresópolis e Valença, cuja circulação de hantavírus patogênico foi previamente confirmada ou de municípios com evidência sorológica de infecção por hantavírus ou amostras de pacientes procedentes de municípios limítrofes ao território mineiro e paulista

3) amostras de pacientes, cujas fichas epidemiológicas continham dados demográficos (sexo e idade), além dos dados clínico-epidemiológicos.

4) disponibilidade de amostra biológica para pesquisa de hantavírus (100 microlitros).

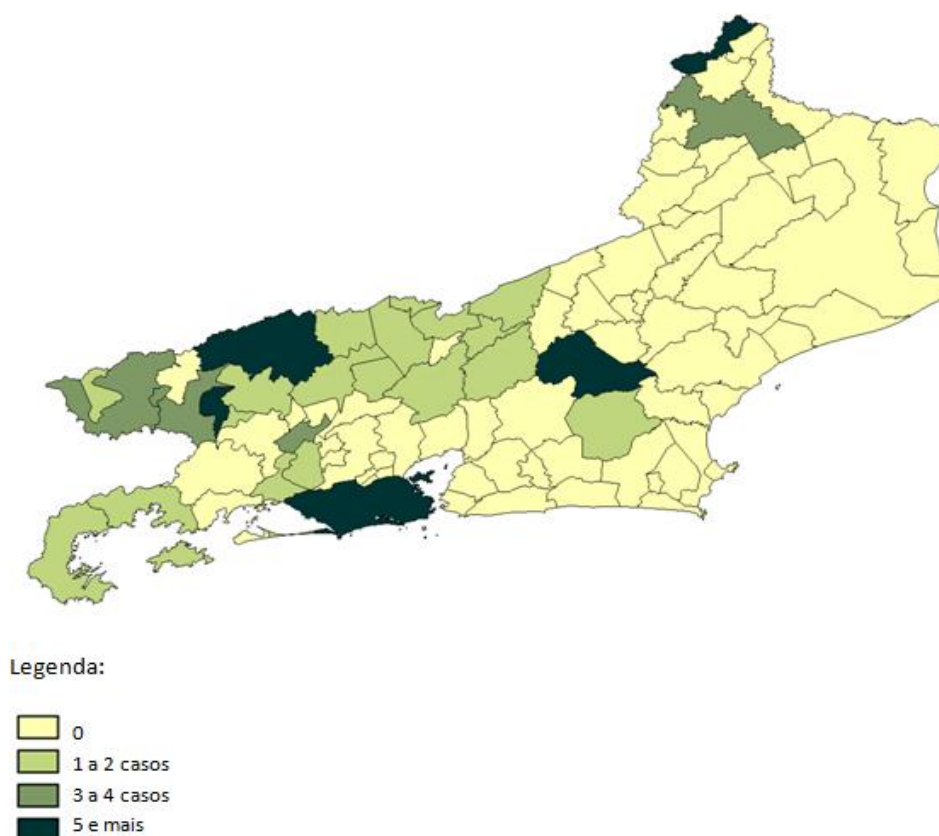


Figura 4.1 Número de amostras pesquisadas soronegativas para leptospirose distribuídas por município do Estado do Rio de Janeiro no período de 2008 a 2011.

Município do Rio de Janeiro	Número de amostras
Angra dos Reis	2
Barra do Piraí	1
Barra Mansa	4
Comendador Levy	1
Itaguaí	1
Itaperuna	3
Itatiaia	2
Nova Friburgo	8
Paracambi	4
Paraíba do Sul	1
Paraty	1
Paty do Alferes	1
Petrópolis	1
Pinheiral	2
Porciúncula	9
Porto Real	3
Resende	3
Rio das Flores	1
Rio de Janeiro	39
São José do Vale do Rio Preto	1
Sapucaia	1
Seropédica	2
Silva Jardim	1
Teresópolis	1
Três Rios	2
Valença	5
Vassouras	1
Volta Redonda	6
Ignorado	1
<b>ESTADO DO RIO DE JANEIRO</b>	<b>Total=108</b>

Tabela 4.1 Número de amostras pesquisadas soronegativas para leptospirose distribuídas por município do Estado do Rio de Janeiro no período de 2008 a 2011.

### **4.3.Descrição das variáveis estudadas**

Os dados constantes nas fichas epidemiológicas foram analisados em relação às informações demográficas, às variáveis de idade, sexo, mês e ano no qual se iniciaram as manifestações clínicas dos casos descartados, sorologicamente (microaglutinação negativa), de leptospirose. Os municípios de residência também foram listados. Em adição, todos os casos que atendessem aos critérios de inclusão estabelecidos foram digitados em um banco de dados construído especialmente para esta pesquisa com o programa EXCEL versão 2013.

A partir do levantamento das variáveis clínico-epidemiológicas disponíveis nas fichas epidemiológicas, foram avaliados o município de residência, a data dos primeiros sintomas, data de coleta, tempo decorrido entre data dos primeiros sintomas e data da coleta (Anexo 1: Ficha de solicitação de exames para Leptospirose LRNL).

### **4.4.Atividades Laboratoriais**

O Laboratório de Referência Nacional para Leptospirose realiza diagnóstico molecular, sorológico e cultura de leptospira, entretanto consideramos para o nosso estudo as amostras com diagnóstico sorológico negativo. O diagnóstico sorológico pela reação de microaglutinação é confirmado com base em amostras pareadas de soros do mesmo paciente, com intervalo de sete dias entre as coletas. Amostras que apresentem soroconversão com aumento de quatro vezes no título de anticorpos, ou amostras únicas apresentando títulos iguais ou superiores a 1:800 são consideradas positivas.

O Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz realizou as seguintes atividades:

- *Análise IgG hantavirus Araraquara*

As 108 amostras de soro e/ou sangue foram submetidas ao teste sorológico seguindo os procedimentos preconizados no Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses para a pesquisa de anticorpos da classe IgG com a utilização da proteína N recombinante do vírus Araraquara fornecido pela Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto segundo protocolo descrito por Figueiredo et al. (2009). Para realização do teste, placas de 96 poços foram sensibilizadas com proteína recombinante do nucleocapsídeo do hantavírus Araraquara (ARAV-N) na metade superior (linhas A, B, C e D) e extrato de *Escherichia coli* usado como controle negativo na metade inferior (linhas E, F, G e H) diluídos em solução tampão

carbonato-bicarbonato na concentração de 0,2µg/ µL, durante incubação por uma noite “overnight” a 4°C. Em seguida, após lavar a placa por 5 vezes com PBS pH 7.4 acrescido de Tween (PBS-T) 1X a 0,05%, foi adicionada solução de bloqueio (leite em pó desnatado a 10% em PBS-T). Após incubação da placa a 37°C por duas horas e subsequente etapa de lavagem, as amostras de soro sabidamente positivas e negativas utilizadas como controle do teste, e as amostras em teste foram adicionadas na diluição de 1/400 em solução de bloqueio. Após nova incubação a 37°C por uma hora e etapa de lavagem por seis vezes, anticorpos secundários anti-IgG humano marcado com peroxidase foram utilizados como conjugado na diluição de 1/2000 em solução de bloqueio. Em continuação, após incubar e lavar novamente a placa, o substrato cromogênico ABTS (KPL, USA) foi adicionado e a placa então foi incubada por 20min a 37°C. Após o bloqueio da placa com adição de HCl a 1M, a absorbância foi mensurada a 405 nm em espectrofotômetro. A diluição do soro foi considerada positiva quando a densidade ótica (DO) foi superior a 0,3. A DO final de cada diluição de soro foi calculada como a diferença entre o valor da DO mensurada nos poços sensibilizados com a proteína ARAV-N e aqueles sensibilizados com o antígeno controle negativo. Um título >1: 400 foi considerado positivo.

- *Análise IgM HANTEC*

Para a pesquisa de anticorpos da classe IgM das de 108 amostras humanas foi utilizado o Kit Hantec IgM, desenvolvido pelo Instituto Carlos Chagas FIOCRUZ-PR, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde para diagnóstico das hantavirose. Brevemente, strips de oito poços previamente adsorvidos com antígenos recombinantes purificados de hantavírus, assim como os demais reagentes, foram retirados da geladeira e deixados à temperatura ambiente por 30 minutos. Os strips foram então lavados com tampão de lavagem utilizando 300µl a cada poço e posteriormente virados para baixo até o momento do uso. O diluente de amostras/conjugado foi preparado com tampão PBS 10X, Tween 20 0,05%, lectina de leite 2% e água destilada. As amostras e os controles foram testados nas diluições 1/100, 1/400, 1/1600 e 1/6400, com exceção do controle positivo que era testado apenas até a diluição 1/1600. Todas as amostras foram testadas em duplicata. As strips ímpares eram sensibilizadas pelo antígeno recombinante específico de hantavírus e as strips pares com antígeno negativo/inespecífico.

Após a distribuição das amostras nas strips, estas foram seladas e incubadas a 37 °C por 30 minutos e subsequentemente lavadas por cinco vezes com tampão de lavagem (300 µl/poço). Enquanto isso, o anticorpo secundário anti-IgM conjugado com HRP preparado na diluição 1/300, após homogeneização, foi adicionado 100 µl do conjugado em cada poço das

strips. Novamente as placas foram seladas e incubadas a 37°C por 30 minutos e lavadas, conforme descrito anteriormente. Em seguida, após adição de 100 µl do substrato tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço, as placas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Por fim, após bloqueio da reação a absorvância foi mensurada em um espectrofotômetro de microplacas equipado com filtro de 450nm. As absorvâncias das amostras foram calculadas subtraindo as densidades óticas (DO) obtidas nas strips sensibilizadas com antígenos de hantavírus com as strips onde havia antígeno inespecífico. Os valores das absorvâncias foram, somados nas quatro diluições de cada amostra. A amostra foi considerada positiva quando a somatória dos valores de absorvância apresentasse um valor superior a 1,100 e negativa quando os valores se apresentavam inferiores a 0,900. Amostras cujo somatório se mostrasse igual ou superior a 0,900 e igual ou inferior a 1,100 foram consideradas indeterminadas. O ensaio foi considerado validado quando o somatório dos valores das absorvâncias do controle positivo se apresentasse maior que 1,100 e do controle negativo menor que 0,400.

- *Análise Molecular*

As amostras com menos de três dias de doença, independentemente da ausência de sororreatividade para hantavírus, foram submetidas também à análise molecular conforme descrito sucintamente a seguir

Para realização da extração do RNA viral em amostras humanas foi utilizado o kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), onde 140µL de soro das amostras reativas pelo ensaio imunoenzimático foram adicionados em 560µL de tampão AVL em tubos de 1,5mL e posteriormente foram misturados no vortex por 15 segundos. A solução foi incubada a temperatura ambiente por 10 min. Rapidamente os microtubos foram centrifugados para remover gotas da parte interna da tampa. Em seguida, foram adicionados 560µL de etanol (96-100%) às amostras e misturadas no vortex por 15 segundos. Logo em seguida, foram centrifugadas rapidamente para retirada de gotas na parte interna da tampa. Com cuidado, a mistura foi aplicada para as colunas QIAamp Spin sem tocar no aro interno. Fechada a tampa, a mistura foi centrifugada a 8000 rpm (6000g) por 1 minuto. Em sequência, as colunas QIAamp Spin foram transferidas para tubos coletores de 2 mL limpos e os tubos contendo o filtrado foram descartados. Posteriormente, 630µL restantes da mistura foram aplicados na coluna QIAamp Spin e as amostras foram novamente centrifugadas a 8000 rpm (6000g) por 1 minuto. A coluna QIAamp Spin foi transferida para um tubo coletor de 2 mL limpo e os tubos contendo o filtrado foram descartados. Em uma nova etapa, foram adicionados 500µL do tampão AW1 nas colunas QIAamp Spin sem tocar no aro interno. As amostras foram

centrifugadas a 8000 RPM (6000g) por 1 minuto. Em seguida, as colunas QIAamp Spin foram alocadas em tubos coletores de 2 mL limpos e os tubos contendo o filtrado foram descartados. 500µL do tampão AW2 foi adicionado nas colunas QIAamp Spin sem tocar no aro interno e sequencialmente centrifugadas a 14000 RPM (20000g) por 3 minutos. As colunas QIAamp Spin foram colocadas em tubos coletores de 2 mL limpos e os tubos contendo o filtrado foram descartados. As colunas QIAamp Spin foram colocadas em novos tubos coletores e os tubos coletores contendo o filtrado foram descartados. A 14000 rpm (20000g) as amostras foram centrifugadas por 1 minuto. Posteriormente, as colunas QIAamp Spin foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e os tubos coletores contendo o filtrado foram descartados. Cuidadosamente, as colunas QIAamp Spin foram abertas e 40µL de tampão AVE foram adicionados, seguido de incubação a temperatura ambiente por 1 minuto e posterior centrifugação a 8000 RPM (6000g) por 2 minutos. Finalmente, as alíquotas de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

#### *Transcrição Reversa do RNA (RT) com Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)*

A partir do RNA total extraído foram realizadas a síntese e posterior amplificação do cDNA em uma única etapa (One Step PCR) com utilização do Mini Kit SuperScript III TM Reverse Transcriptase One Step (Invitrogen) e de primers específicos para amplificação parcial do segmento S viral. Na PCR, tubos de 0,5 mL foram utilizados para preparar a solução contendo: 0,5 µl (100 pmol/µl) do primer H04-25F, 0,4 µl (100 pmol/µl) do primer H733-752R, 0,5 µl de SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase, 12,5 µl (0,4 mM de dNTP + 3,2 mM de MgSO<sub>4</sub>) de 2X Mix da reação, 8,9 µl de água nuclease-free e 0,2 µl (50mM) de Cloreto de Magnésio (MgSO<sub>4</sub>), com um volume total de 23 µl. Esta mistura era então distribuída em microtubos para PCR (0,2 mL) e então era acrescentado 2 µl de RNA da amostra, totalizando um volume final de 25 µl. Os tubos eram então alocados em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) que realizava uma primeira etapa de 48°C por 45 minutos para amplificação do cDNA, seguida de uma fase inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 51°C por 40 segundos, 68°C por 50 segundos, finalizando com uma etapa de extensão de 68°C por 5 minutos e uma temperatura final de 4°C. Uma PCR Semi-Nested foi realizada para aumentar a sensibilidade da amplificação. Tubos de 0,5 mL foram utilizados para preparar a solução contendo: 0,25 µl (100 pmol/µl) do primer H274-791F (5'-CCACTTGATCCAACAGGG - 3'), 0,25 µl (100 pmol/µl) do primer H733-752R (5' -TCWATCCTTTCCATCCARTC - 3') (Raboni et al. 2007, Guterres et al. 2013), 0,1 µl (5U/µl) de Taq platinum DNA polimerase (Invitrogen), 0,25µl de dNTP (20mM), 2,5 µl de



tampão PCR 10X, 0,75 µl (50mM) de Cloreto de Magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e 18,9 µl de água nuclease-free, com um volume total de 23 µl. Esta mistura era então distribuída em microtubos para PCR (0,2 mL) e então era acrescentado 2 µl do produto da primeira PCR da amostra, com um volume final de 25 µl. Os tubos eram então alocados em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) que realizava uma primeira etapa de 94°C por 2 minutos seguida por 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, uma extensão de 72°C por 5 minutos e uma temperatura final de 4°C.

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

#### **4.5.Considerações Éticas**

O presente estudo esta inserido no projeto coordenado pela Dra Elba Regina Sampaio de Lemos e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Protocolo 559/10). Em anexo 3 o formulário CEP.

#### **4.6.Análise Estatística**

Estudo descritivo, com análise global e percentual dos dados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Características dos Pacientes Incluídos no Estudo

Após as análises dos dados dos 108 casos, foi possível, observar que 88% eram pacientes cujas amostras foram procedentes do LACEN Noel Nutels e apenas 12% foram oriundas de hospitais gerais no estado do Rio de Janeiro (Figura 5.1).

Dados demográficos e epidemiológicos demonstraram que 71% das amostras eram de pacientes do sexo masculino, nas faixas etárias 20-29 e 30-39 anos (Figuras 5.2 e 5.3).

Os meses chuvosos e de temperaturas mais elevadas representaram o período com um maior número de envio de amostras, evidenciando assim uma sazonalidade do agravo (Figuras 5.4 e 5.5).

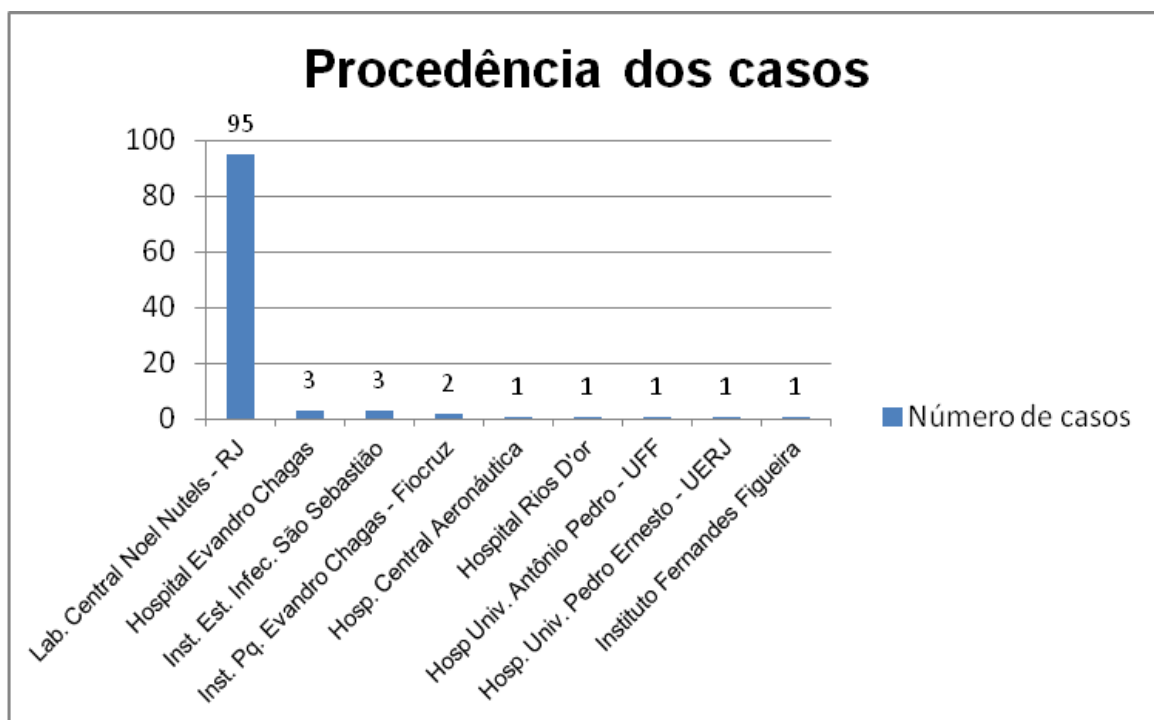


Figura 5.1 Distribuição, quanto a procedência, dos casos suspeitos de leptospirose, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospirose, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011)



Figura 5.2 Distribuição, quanto ao sexo, dos casos suspeitos de leptospiroses, soronegativos, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011).

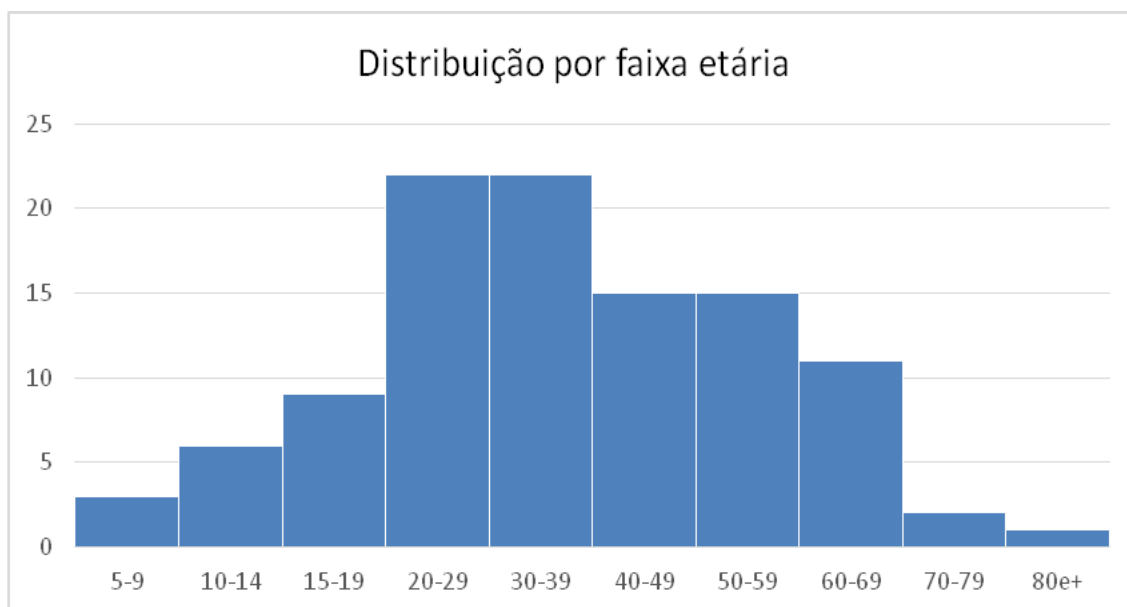


Figura 5.3 Distribuição, quanto à faixa etária, dos casos suspeitos de leptospiroses, soronegativos, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011).

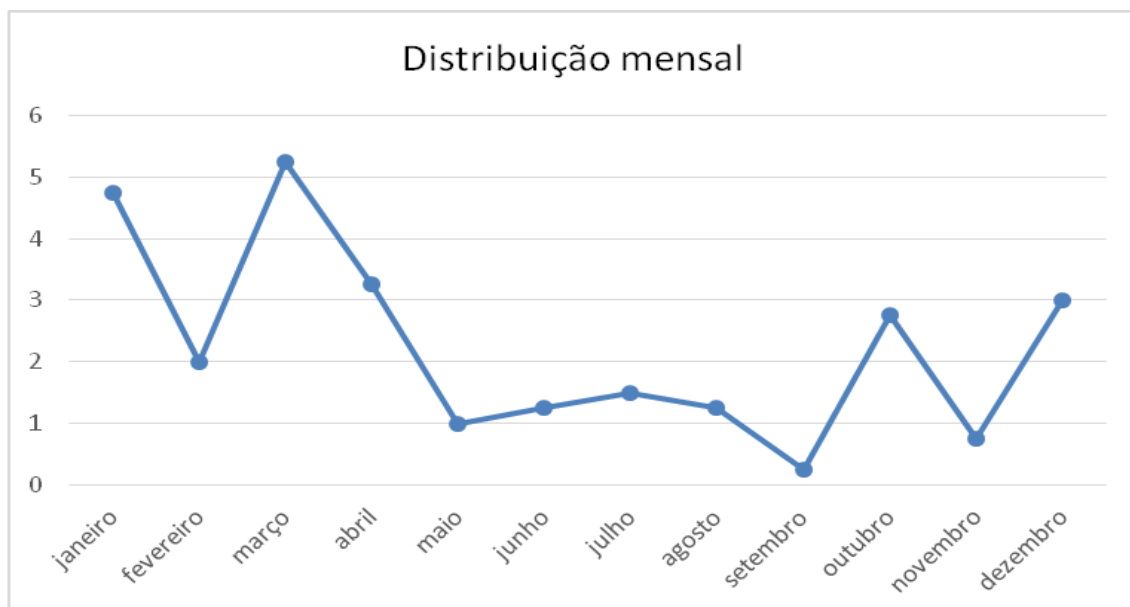


Figura 5.4 Distribuição mensal do número de casos suspeitos de leptospiroses, soronegativos, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011).

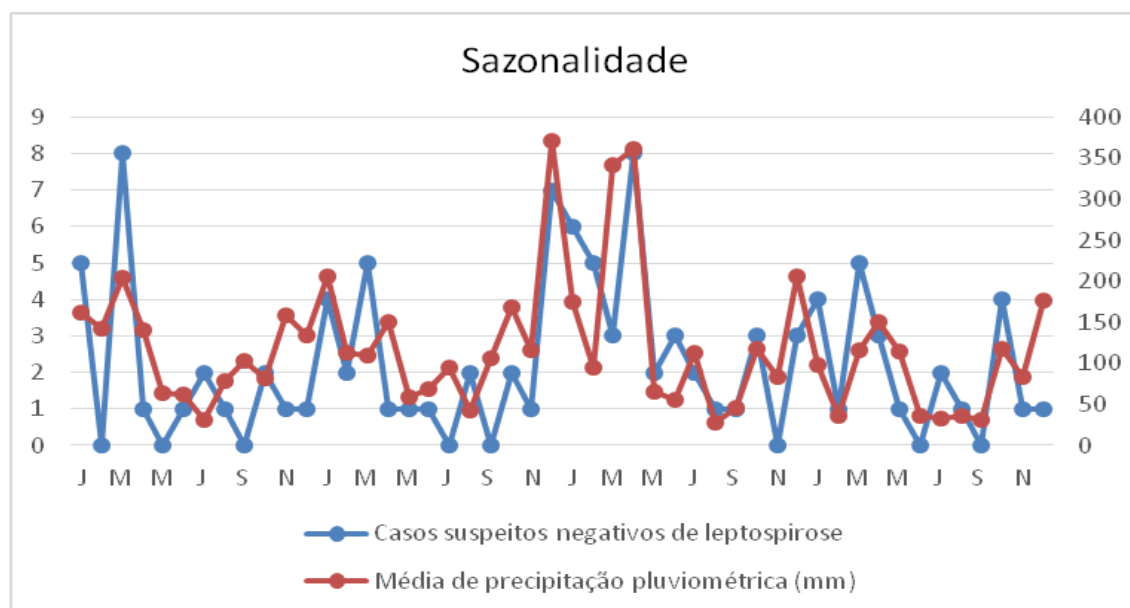


Figura 5.5 Distribuição, em relação à sazonalidade e aos índices pluviométricos, dos casos suspeitos de leptospiroses, soronegativos, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011).

Em relação à história epidemiológica, o provável local de infecção foi o domicílio (43.5%). O relato de imersão prolongada em lama e água de enchente foi verificado em 33.3% dos casos. Presença de roedores foi relatado em 28.7% dos casos. (Figura 5.6)

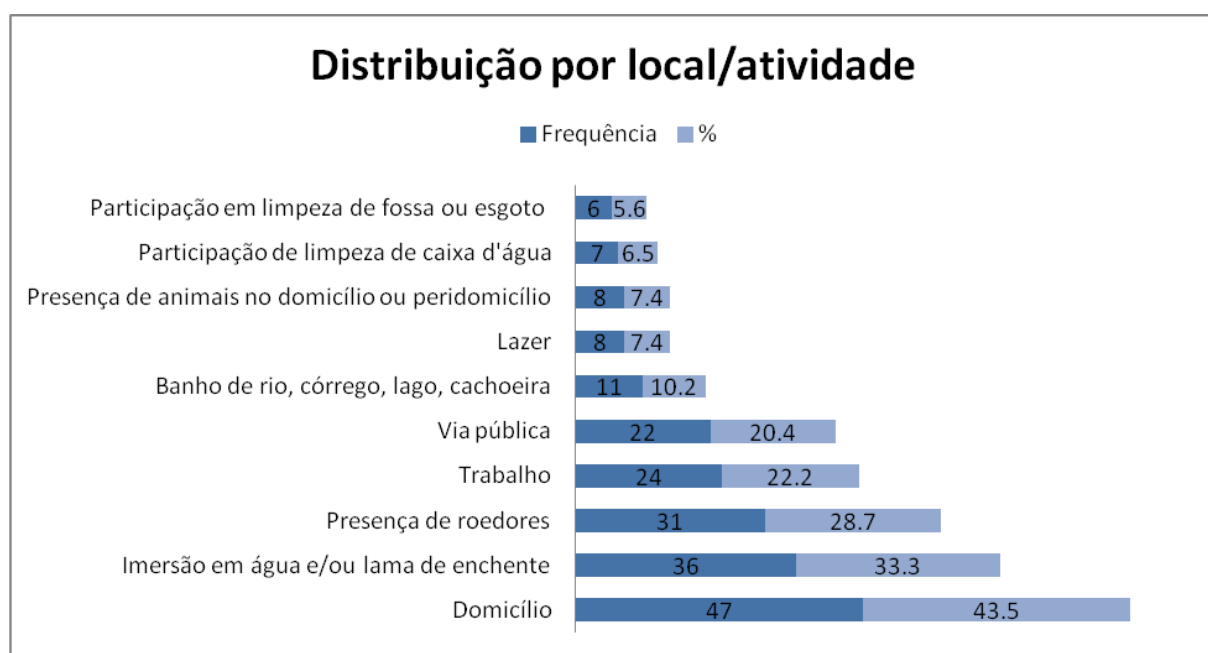


Figura 5.6 Distribuição, em relação ao local provável de infecção e atividade relacionada à exposição, dos casos suspeitos de leptospirose, soronegativos, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospirose, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011).

Apesar da hipótese diagnóstica inicial de leptospirose, uma doença com comportamento bifásico, característica que torna necessária a coleta de uma segunda amostra para o diagnóstico sorológico, em apenas 4.4% das amostras incluídas neste estudo tinham amostras pareadas.

Em relação à Tabela 5.1, é possível verificar que das 76 amostras com os dados preenchidos, 37.2% dos pacientes apresentavam até 7 dias de doença, correspondendo a fase aguda da leptospirose. As demais amostras, com mais de 7 dias de doença, foram coletadas na fase imune. Apenas seis amostras cuja coleta foi realizada no prazo de dois dias foram submetidas à análise molecular.

A pesquisa de anticorpos anti-hantavírus foi negativa nas 108 amostras testadas, assim como a detecção do RNA viral foi ausente.

Tabela 5.1 Distribuição das frequências dos dias de doença de casos suspeitos de leptospiroses, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011).

Dias de Doença	Frequência absoluta (n°)	Frequência relativa (%)	Frequência absoluta acumulada (n°)	Frequência relativa acumulada (%)
1	3	2,8	3	2,8
2	3	2,8	6	5,6
3	6	5,6	12	11,1
4	4	3,7	16	14,8
5	11	10,2	27	25,0
6	7	6,5	34	31,5
7	6	5,6	40	37,0
8	4	3,7	44	40,7
9	5	4,6	49	45,4
10	9	8,3	58	53,7
12	1	0,9	59	54,6
14	1	0,9	60	55,6
15	4	3,7	64	59,3
16	2	1,9	66	61,1
17	2	1,9	68	63,0
18	3	2,8	71	65,7
20	2	1,9	73	67,6
22	2	1,9	75	69,4
26	1	0,9	76	70,4
Ignorado	32	29,6	108	100,0
<b>Total</b>	<b>108</b>	<b>100,0</b>		

Em relação a sintomatologia, a Tabela 5.2 demonstra as principais manifestações clínicas em frequência de ocorrência. Além de febre e alteração respiratória, 87% apresentavam mialgia, 47.2% icterícia, 31.5% anúria, 31.5% oligúria, 12% com fenômenos hemorrágicos e apenas 6.5% com hemorragia pulmonar. Informações específicas quanto à dispneia e/ou tosse não constavam nos dados coletados, o que poderia auxiliar no raciocínio diagnóstico. Quanto aos testes laboratoriais utilizados neste estudo, nenhum exame laboratorial inespecífico, como hemograma ou bioquímica, se encontravam disponíveis nas fichas avaliadas. Assim, não foi possível obter informações sobre a presença de alterações hematológicas como plaquetopenia, atipia linfocitária, hipoxemia, entre outras características frequentes no quadro de FPL e SPH. Dados de imagem de radiografias e/ou tomografias de tórax também foram ausentes, e, assim, não estavam disponíveis alterações radiológicas imprescindíveis na investigação etiológica dos casos.

Tabela 5.2 Distribuição da frequência de sinais e sintomas dos casos suspeitos de leptospiroses, cujas amostras foram encaminhadas ao Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (2008-2011).

<b>Manifestação clínica</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
Alteração respiratória	108	100.0
Febre	108	100.0
Mialgia	94	87.0
Icterícia	51	47.2
Anúria	34	31.5
Oligúria	34	31.5
Cefaléia	20	18.5
Congestão Conjuntival	20	18.5
Vômito	13	12.0
Exantema	13	12.0
Sinais hemorrágicos	13	12.0
Prostração	11	10.2
Dor na panturrilha	7	6.5
Hemorragia pulmonar	7	6.5
Diarréia	7	6.5
Insuficiência renal	6	5.6
Náusea	5	4.6
Dor abdominal	4	3.7
Hemorragia Gastrointestinal	3	2.8
Arritmia	3	2.8
Artralgia	3	2.8
Meningismo	2	1.9
Anorexia	1	0.9
Dor lombar	1	0.9

## **6. DISCUSSÃO**

Embora as duas zoonoses, leptospirose e hantavirose, sejam consideradas doenças de notificação compulsória e tenham grande importância para a Saúde Pública de nosso país, muitas questões relacionadas à vigilância epidemiológica precisam ser rediscutidas no intuito de direcionar o diagnóstico diferencial nos quadros febris agudos com alteração respiratória.

Com mais de 1.600 casos da SPH confirmados no Brasil, fica o questionamento do motivo pelo qual não existem casos humanos notificados no estado do Rio de Janeiro. Diante desta dúvida foi proposta a investigação de anticorpos anti-hantavírus em amostras soronegativas para leptospirose de pacientes com febre e alteração respiratórias, em regiões do estado fluminense onde o roedor reservatório infectado por hantavírus Jiquitiba tenha sido identificado.

### **6.1. Características das amostras dos Pacientes**

Embora as amostras analisadas tenham sido provenientes de casos suspeitos de leptospirose, mas não confirmados sorologicamente, os dados obtidos se assemelham aos dos outros estudos epidemiológicos sobre casos confirmados de leptospirose no Brasil. Em nossas análises 33.3% referiam imersão prolongada em lama e água de enchente, em 28.7%, a presença de roedores no domicílio ou peridomicílio. A análise da distribuição temporal foi possível verificar que as amostras foram enviadas principalmente nos meses chuvosos de março, dezembro e janeiro. Em nossa análise 77.71% dos pacientes eram do sexo masculino e apenas 22.3% mulheres, com a maioria na faixa etária de 20 a 39 anos, evidenciando o acometimento de uma população economicamente ativa, causando afastamento das atividades laborais e prejuízo econômico ao país. Estes dados estão em concordância com os descritos na literatura, considerando, entre outros fatores: (i) o perfil sazonal característico de um país tropical em desenvolvimento, no qual as chuvas e as enchentes constituem grandes fontes favorecedoras do contato com as leptospiros patogênicas, (ii) o sexo, com predomínio do gênero masculino e (iii) a faixa etária, já que foi observada uma maior frequência de indivíduos na faixa etária de adulto jovem, de profissão ou ocupação variada com antecedente epidemiológico. (Marotto et al 1997, Barcellos et al, 2000 e 2001, Gonçalves et al , 2006, Gonçalves JR et al, 1992, Pereira MM & Andrade J et al 1988).

O critério de seleção das amostras suspeitas de leptospirose para o estudo apenas considerou duas manifestações clínicas, a febre e alteração respiratória em decorrência, não



somente, da escassez de informações disponíveis, mas, essencialmente também, pela necessidade de se incluir as alterações respiratórias como tosse e dispneia que ocorrem caracteristicamente na fase cardiopulmonar da SPH, embora outras manifestações clínicas como mialgia, cefaleia, mal estar e sintomas gastrointestinais possam estar presentes na fase prodrômica (Peters et al 1998).

Em relação ao diagnóstico sorológico da leptospirose, sabe-se que é necessário o pareamento das amostras para o diagnóstico definitivo através da técnica de MAT (Levett 2001) e que, de acordo com a fase da doença, a sensibilidade do teste se apresenta variada (Brandão et al 1998). Levando em consideração esta limitação do MAT, além do pareamento das amostras considerando a cinética de anticorpos, tem sido sugerido que outros métodos diagnósticos sejam empregados na fase aguda como cultura e análise molecular (Koury et al, 2006; Musso et al 2013). Como foram analisadas amostras únicas pelo MAT, por falta de amostras pareadas, fica claro que não se pode descartar a possibilidade de que algumas das amostras incluídas no estudo possam ser de casos de leptospirose, cuja confirmação não tenha sido possível em decorrência da não utilização do teste diagnóstico adequado, considerando a cinética da resposta imune do paciente à bactéria.

É imprescindível considerar também que da mesma forma que a ficha de notificação do agravo do SINAN, a ficha utilizada pelo LRNL em nosso estudo, não contempla a obtenção de dados laboratoriais e radiológicos que, inquestionavelmente, poderiam contribuir para o diagnóstico diferencial com outras doenças, tais como dengue, malária, febre amarela, febre entérica, hepatite viral, pneumopatias, brucelose, febre Q e infecções por hantavírus, arnavírus e rickettsia. Esta assertiva é reforçada com a certeza de que tais agravos possuem aspectos não apenas clínicos, mas também relacionados aos exames complementares que, em regiões de circulação de diversos patógenos infecciosos, podem nortear o diagnóstico provável. Desta forma, a criação de algoritmos e/ou protocolos clínicos para o raciocínio diagnóstico diferencial entre doenças que mimetizam a leptospirose e hantavirose seriam fortemente recomendados. Um estudo clínico-epidemiológico sobre a hantavirose, na região de Ribeirão Preto-SP, usou um fluxograma que auxiliou no diagnóstico clínico da SPH, através da realização de hemograma completo e radiografia de tórax de emergência logo no primeiro atendimento. Elaboramos um protocolo simples que pode ser aplicado, fato que auxiliaria na verificação da presença ou não da SPH no território fluminense (Campos, 2002).

## 6.2.. Pesquisa de anticorpos anti-hantavírus

Dentre as amostras com suspeita inicial para leptospirose, selecionamos aquelas que apresentavam síndrome febril e respiratória oriundas de regiões limítrofes a zonas que circulam roedores sigmodontíneos, no intuito de abranger características semelhantes aos quadros de FPL e SPH e restringir o estudo a áreas consideradas potencialmente de risco de infecção humana.

A dificuldade do diagnóstico e do exercício do diagnóstico diferencial das síndromes febris agudas no Rio de Janeiro reflete a complexidade da execução da Vigilância Epidemiológica das doenças emergentes e reemergentes. Esta ação envolve a participação dos profissionais da área da saúde que fazem a assistência e são os primeiros a receber os casos suspeitos, além das redes de laboratórios e dos centros universitários e institutos de pesquisa.

Este trabalho de pesquisa desenvolvido em dois Laboratórios de Referência Nacional permitiu verificar a necessidade de se discutir ações para o fortalecimento dos elos da vigilância epidemiológica e sindrômicas de duas zoonoses de importância nacional, mas quase sempre negligenciadas, em especial, no estado do Rio de Janeiro, onde, apesar da circulação do hantavírus, até o momento não tem caso de SPH notificado.

Existem diversos estudos sobre a confusão diagnóstica entre a leptospirose e hantavirose (Kudesia et al 1988, Antoniadis et al 1995, Yersin et al 2000, Sion et al 2002, Clement et al 2005, dos Santos et al 2009, Haas et al 2013). Entre as publicações citadas, a série de casos, dos autores Haas e colaboradores chama a atenção para a similaridade das duas zoonoses no início do quadro clínico e a dificuldade no seu diagnóstico (Haas et al 2013)

No Brasil, estudo desenvolvido por Hindrichsen e colaboradores, em 2004, relata uma série de dez casos com sorologia reagente para hantavirus e para leptospirose, a partir de uma casuística de 29 pacientes admitidos no serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC/UFPE, cujo diagnóstico clínico inicial foi de leptospirose aguda. Todos os dez casos apresentaram anticorpos (IgM e IgG) para leptospirose. Dos dez pacientes, dois também tinham anticorpos IgM para hantavirus do sorotipo Puumala e oito tinham anticorpos IgG para hantavirus, assim distribuídos: quatro para Seoul, dois para Puumala, um para Hantaan e Puumala e outro para Seoul e Puumala. Neste estudo não se observou quadro clínico sugestivo de doença respiratória grave como a descrita nos Estados Unidos e no Sudeste do Brasil.

Embora não existam casos da SPH no estado do Rio de Janeiro, onde leptospirose é frequentemente descrita, escassos estudos têm demonstrado evidência sorológica de infecção por hantavírus em população humana (Lemos et al 2003, Lamas 2006) em áreas, nas quais

sabidamente circulam roedores silvestres infectados com hantavírus (Sobreira et al 2008, Oliveira et al 2009).

O presente estudo, foi desenvolvido inicialmente apenas com amostras de casos suspeitos de leptospiroses procedentes da região serrana do Rio de Janeiro. Em decorrência do pequeno e limitado número de amostras, foram incluídas, posteriormente, amostras de pacientes procedentes também das regiões do Médio Paraíba, Centro-Sul Fluminense, Noroeste fluminense e Costa Verde, além dos municípios limítrofes aos estados de MG e SP onde existem casos notificados da SPH e da região metropolitana do RJ, onde inquéritos sorológicos evidenciaram anticorpos anti-hantavirus em pacientes hiv reativos (Lamas 2006).

Em nosso estudo, todas as amostras submetidas à análise sorológica foram negativas para a infecção por hantavírus. Dentre as justificativas encontradas para a ausência de sororreatividade ao ARAV-N poderíamos especular: (i) o pequeno número de amostras analisadas, considerando a baixa prevalência de anticorpos frequentemente observada nos estudos realizados de soroprevalência (Lamas 2006); (ii) a restrição quanto à manifestação clínica na qual foram incluídas amostras apenas de pacientes com manifestação respiratória. Como o objetivo do presente estudo se restringiu ao diagnóstico diferencial da leptospirose com a SPH, os critérios de inclusão estabelecidos quase que certamente podem ter influenciado na falta de detecção de infecção por hantavírus. Assim, ao excluirmos as amostras de pacientes com o quadro clássico da leptospirose, isto é, sem manifestação respiratória, poderíamos deixar de analisar amostras de pacientes infectados pelo hantavírus Seoul, mantido em ratos sinantrópicos do gênero *Rattus*, cuja manifestação clínica não está associada com quadro respiratório, e (iii) a dificuldade de se realizar análise comparativa entre os diversos estudos, considerando os diferentes antígenos utilizados nos testes quase que invariavelmente, "in house" (Himsworth et al 2013).

Estudos relacionados aos roedores reservatórios têm confirmado a presença do genótipo Juquitiba no Estado do Rio de Janeiro (Oliveira et al 2009 Guterres et al 2013) e, assim, considerando a inexistência de casos de SPH no território fluminense, é possível cogitar a falta de suspeita diagnóstica por parte dos profissionais da saúde, a identificação de uma variante não causadora de doença em humanos, já que o hantavírus Juquitiba do estado do Rio de Janeiro se encontra em uma clade, a partir da análise filogenética, separada de outros hantavírus Juquitiba descritos na literatura (Guterres et al 2013).

Considerando a cinética da resposta da infecção por hantavírus, seis amostras foram submetidas à análise molecular, já que foram coletadas nos dois primeiros dias de doença, período no qual os anticorpos podem não ser detectados. Como os resultados foram negativos, duas hipóteses devem ser consideradas como justificativa: (i) as amostras seriam de pacientes

com leptospirose, cujo diagnóstico não foi confirmado pois foram submetidas apenas ao MAT sem a complementação de outra técnica ou mesmo da análise sorológica de uma segunda amostra pareada e (ii) amostras foram preservadas e manuseadas de forma inadequada, considerando a instabilidade do RNA viral, o que determinou a não amplificação do genoma viral.

É imprescindível reforçar sobre as limitações de um estudo retrospectivo, com base nos dados secundários de fichas epidemiológicas preenchidas sem o objetivo de pesquisa. A fragilidade da completude dos dados e a inconformidade das fichas epidemiológicas, na ausência de um diagnóstico definitivo, raramente auxiliam no direcionamento da investigação e na identificação etiológica, que entre outros fatores, dificultam o diagnóstico diferencial entre as diversas doenças infecciosas febris agudas clinicamente semelhantes.

Finalmente, diante dos resultados obtidos e da necessidade de vigilância da SPH, é preciso reforçar i) a importância da realização de estudos prospectivos no Brasil e principalmente no Rio de Janeiro, a partir da vigilância sindrômica febril associada a alterações respiratórias, ii) a necessidade de revisão das fichas de notificação compulsória destes dois agravos em nosso território e iii) a urgente conscientização pelos profissionais de saúde da relação entre a fase da doença e o método diagnóstico laboratorial empregado.

## 7. CONCLUSÕES

- Embora as amostras suspeitas de leptospirose tenham sido seronegativas para leptospirose, a falta de testes laboratoriais complementares como teste sorológico da segunda amostra, análise molecular e isolamento bacteriano, não nos autoriza caracterizar as amostras analisadas como leptospirose negativas
- Os dados relacionados à faixa etária e ao sexo dos casos suspeitos de leptospirose do Centro Colaborador da OMS para Leptospiroses assim como o período sazonal foram concordantes com outros estudos de casos confirmados de leptospirose no Brasil
- O resultado negativo obtido das análises sorológica e molecular não descarta a possibilidade da infecção humana por hantavírus no estado do Rio de Janeiro, considerando o pequeno número de amostras analisadas e dos critérios de inclusão nos quais somente amostras de pacientes com manifestação respiratória foram selecionadas.
- Os dados secundários recuperados nas fichas, cujo preenchimento frequentemente se apresentou incompleto e às vezes ilegível, assim como a preservação e manipulação inadequadas das amostras, nas quais o RNA viral pode ter sido degradado, foram algumas limitações do nosso estudo

## 8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antoniadis A, Alexiou-Daniel S, Fidani L, Bautz EFK. Comparison of the clinical and serologic diagnosis of haemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis. *European Journal of Epidemiology* 11: 91-92, 1995.

Badra SJ, Maia FG, Figueiredo GG, Dos Santos Junior GS, Campos GM, Figueiredo LT, Passos AD 2012. A retrospective serologic survey of hantavirus infections in the county of Cassia dos Coqueiros, State of Sao Paulo, Brazil. *Rev.Soc. Bras. Med. Trop.* 45 (4), 468–470.

Balassiano IL, Vital-Brazil JM, Pereira MM, 2012. Leptospirosis diagnosis by immunocapture polymerase chain reaction: a new tool for early diagnosis and epidemiologic surveillance *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease* Volume 74, Issue 1 , Pages 11-15.

Barcellos C, Sabroza PC. Socio-environmental determinants of the leptospirosis outbreak of 1996 in western Rio de Janeiro: a geographical approach. *Int J Environ Health Res.* 10: 310-313, 2000.

Barcellos C, SPC. 2001. The place behind the case: leptospirosis risks associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. *Reports in Public Health* 17:1–13.

Barthi AJ, Nally JE , Ricaldi JN , Matthias MA , Diaz MM , Lovett MA, Levett PN , Gilman RH , Willig MR , Gotuzzo E , Vinetz JM. 2003. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases* 3: 757-771.

Boroja M, Barrie JR, Raymond GS, 2002. Radiographic findings in 20 patients with hantavirus pulmonary syndrome correlated with clinical outcome. *AJR Am.J. Roentgenol.* 178 (1), 159–163.

Brandão AP, Camargo ED, da Silva ED, Silva MV, Abrão RV, 1998 Macroscopic Agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis *J Clin Microbiol*; 36(11): 3138–3142.

Brasil. 2009. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia Leptospirese: Diagnóstico e Manejo clínico/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.

Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle de roedores, Brasília Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2002.

Brett-Major DM, Lipnick RJ. Antibiotic prophylaxis for leptospirosis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2009, Issue 3.

Brito T, Aiello VD, Silva LFF, Silva AMG, Silva LF, Castelli JB, Seguro AC 2013. Human Hemorrhagic Pulmonary leptospirosis: Pathological Findings and Pathophysiological correlations. *Plos One* vol 8 issue 8

Butler JC, Peters CJ. Hantaviruses and hantavirus pulmonary syndrome. *Clin Infect Dis.* 19:387-395, 1994.

Campos GM, Borges AA, Badra SJ, Figueiredo GG, Souza RL, Moreli ML, Figueiredo LT 2009. Pulmonary and cardiovascular syndrome due to hantavirus: clinical aspects of an emerging disease in southeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42 (3), 282–289.

Campos GM, Moro De Sousa RL, Badra SJ, Pane C, Gomes UA, Figueiredo, LT 2003. Serological Survey Of Hantavirus In Jardinópolis County, Brazil. *J. Med. Virol.* 71 (3), 417–422.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2011) Notes from the field: hantavirus pulmonary syndrome—Maine, April 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 60(23):786

Chapman LE, Ellis BA, Koster FT, Sotir M, Ksiazek TG, Mertz GJ, Rollin PE, Baum KF, Pavia AT, Christenson JC, Rubin PJ, Jolson HM, Behrman RE, Khan AS, Bell LJ, Simpson GL, Hawk J, Holman RC, Peters CJ, Ribavirin Study G, 2002. Discriminators between hantavirus-infected and –uninfected persons enrolled in a trial of intravenous ribavirin for presumptive hantavirus pulmonary syndrome. *Clin. Infect. Dis.* 34 (3), 293–304.

Chirathaworn C and Kongpan S. Immune responses to *Leptospira* infection : roles as biomarkers for disease severity. *Braz Infect Dis* 2014;18(1):77-81.

Clement J, Maes P, Muthusetupathi M, Nainan G, Ranst MV, First evidence of fatal hantavirus nephropathy in India, mimicking leptospirosis. Advance Acces publication December 2005.

Clement J, Maes P, Lagrou K, Van Ranst M, Lameire N. A unifying hypothesis and a single name for a complex globally emerging infection: hantavirus disease Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2012) 31:1–5

Coburn J, Truong KN The emergence of severe pulmonary hemorrhagic leptospirosis: question to consider. Frontiers in cellular and infection microbiology 2012.

Coura JR. Dinâmica das Doenças Infecciosas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Brasil; 2013. Capítulos 129 e 163.

Croda J, Neto AN, Brasil RA, Pagliari C, Nicodemo AC, Duarte MI 2010. Leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. Clin Microbiol Infect 16:593–599.

Damasco PV, Ávila CAL, Tapia A et al. 2011. Atypical lymphocytosis in leptospirosis: a cohort of hospitalized cases between 1996 and 2009 in State of Rio de Janeiro, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44(5):611-615.

D`Andrea PS. 2007. Dissertação : estudo sobre o ciclo Silvestre da hantavírose no Estado do Paraná e no Estado do Rio de Janeiro: avaliação potencial de roedores silvstres como reservatórios, em áreas com e sem casos humanos da Síndrome Cardio-pulmonar por Hantavírus.

Da Silva JJP, Dalston MO, de Carvalho JEM, Setúbal S, de Oliveira JMC, Pereira MM. Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 35:1-9, 2002.

Da Rosa Elkhoury, M., da Silva Mendes, W., Waldman, E.A., Dias, J.P., Carmo, E.H. Fernando da Costa Vasconcelos, P., 2012. Hantavirus pulmonary syndrome: prognostic factors for death in reported cases in Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 106 (5), 298–302.



Dolhnikoff M, Mauad T, Bethlem EP, Carvalho CRR 2007. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in Leptospirosis. *Braz J Infect Dis* 11:142-148.

Dupont H, Dupont-Pertdrizet D, Perie JL, Zehner-Hansen S, Jarrige B, Daijardim J B. 1997. Leptospirosis: Prognostic Factors associated with mortality. *Clinical Infectious Diseases* 25:720-4.

Elliott LH1, Ksiazek TG, Rollin PE, Spiropoulou CF, Morzunov S, Monroe M, Goldsmith CS, Humphrey CD, Zaki SR, Krebs JW, et al, 1994. Isolation of the causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* ;51(1):102-8.

Elkhoury MR, Wada MY, Carmo EH, Luna EJA, Elkhoury ANSM, Teixeira KG, Nunes ML, Barbosa NP, Caldas EP, Caldas ACS, Marques AAR, Brito MG, Rubio GBG, Silva LP, Katz G, Delfino D, Travassos da Rosa ES, Moreira FG. Aspectos epidemiológicos da infecção e da patogenicidade por hantavírus no Brasil. 2004. Boletim Eletrônico Epidemiológico: Disponível: <http://www.saude.gov.br/svs>.

EL-Khoury M. CENEPI, FUNASA, Ministério da Saúde-informação pessoal.

Ennis FA, Cruz J, Spiropoulou CF et al. 1997. Hantavirus pulmonary syndrome: CD8+ and CD4+ cytotoxic T lymphocytes to epitopes on Sin nombre virus nucleocapsid protein isolated during acute illness. *Virology.* 238:380-390.

Faine. Guidelines for the control of Leptospirosis. WHO 1982.

Figueiredo LT e colaboradores. Contribuição ao conhecimento sobre a Hantavirose no Brasil. Informe epidemiológico do SUS – IESUS 2000;9(3): 167-178.

Figueiredo LT, Moreli ML, Borges AA, de Figueiredo GG, Badra SJ, Bisordi I, Suzuki A, Capria S, Padula P, 2009a. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on Araraquara virus recombinant nucleocapsid protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81 (2), 273–276.

Figueiredo LT, Moreli ML, de-Sousa RL, Borges AA, de-Figueiredo GG, Machado AM, Bisordi I, Nagasse-Sugahara TK, Suzuki A, Pereira LE, de-Souza RP, de-Souza LT, Braconi CT, Harsi CM, de-Andrade-Zanotto PM, Viral Diversity Genetic Network, C., 2009b.

Hantavirus pulmonary syndrome, central plateau, southeastern, and southern Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 15 (4),561–567.

Figueiredo LTM, de Souza WM, Ferres M, Enria DA. Hantaviruses and cardiopulmonary syndrome in South America. *Virus Research* 2014.

Firth, C., Tokarz, R., Simith, D.B., Nunes, M.R., Bhat, M., Rosa, E.S., Medeiros, D.B.Palacios, G., Vasconcelos, P.F., Lipkin, W.I., 2012. Diversity and distribution of hantaviruses in South America. *J. Virol.* 86 (24), 13756–13766.

Friedlan JS and Warrel DA. 1991. The Jarisch-Herxheimer reaction in leptospirosis possible pathogenesis and review. *Clin Infect Dis.* 13 (2):207-210.

Gavrilovskaya IN, Shepley M, Shaw R, Ginsberg M H, Mackow ER. 1998.  $\beta$ 3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (12) 7074–7079.

Gavrilovskaya, I., Gorbunova, E., Matthys, V., Dalrymple, N., Mackow, E., 2012. The role of the endothelium in HPS pathogenesis and potential therapeutic approaches. *Adv. Virol.* 2012,

Gelse Mazzoni Campos, 2002. Estudo clínico epidemiológico sobre a hantaviose na região de Ribeirão Preto, SP. Dissertação Mestrado em Clínica Médica pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – São Paulo.

Gimaque JB, Bastos MdeS, Braga WS, Oliveira CM, Castilho MdaC, Figueiredo RM, Galusso EdosS, Itapirema EF, Figueiredo LT, Mourao MP 2012. Serological evidence of hantavirus infection in rural and urban regions in the state of Amazonas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107 (1), 135–137.

Gonzales-Sacarani F, Nathanson N. Bunyaviruses. 1990. In Fields BN, Knipe DM(eds), *Fields in Virology*. 2nd. Raven Press, Ltd. New York, p 1195-1238, 1990.

Gonçalves DD, Telez PS, Reis CR, Lopes FMR, Freire RL, Navarro IT, Alves LA, Muller EE, Freitas JC, 2006. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for

leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*; 48:135–140

Gonçalves AJR, Capone D, Paz NA, Paulo RVV, Dias TBCM, Lago VCC, Carvalho LMA 1990. Leptospirosis: observations on changes in clinical manifestations in Rio de Janeiro during a large epidemic in 1988. *Arq Bras Med*. 64:389–397.

Gonçalves AJR, Manhães de Carvalho JE, Guedes e Silva JB, Rosenbaum R, Machado Vieira AR. 1992. Leptospirose pulmonar. *Rev Soc Bras Med Trop* 25(4):261-70.

Gonçalves AJR, Carvalho JEM, et-al. 1992. Hemoptysis and the Adult Respiratory Distress Syndrome as the cause of death in leptospirosis: changes in the clinical and anatomicopathological patterns. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 54:382-92.

Gonçalves FG, Jovem CL, Isac VM et al. 2010. High-resolution computed tomography findings in hantavirus pulmonary syndrome. *J Thorac Imaging*.25:W35-5.

Gonçalves-de-Albuquerque GCF, Burth P, Silva AR, Younes-Ibrahim M, Castro-Faria-Neto HC, and Castro-Faria MV 2012. *Leptospira* and Inflammation Mediators of Inflammation.

Gorbunova E, Gavrilovskaya IN, Mackow ER. 2010. Pathogenic hantaviruses Andes virus and Hantaan virus induce adherens junction disassembly by directing vascular endothelial cadherin internalization in human endothelial cells. *J Virol*.84:7405-11.

Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho AL, Aires TS, Villasboas-Bisneto JC, Queiroz A, Santos AC, Salgado K, Reis MG, Ko AI: Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2008, 14:505–508.

Guerrier G, D’Ortenzio E (2013) The Jarisch-Herxheimer Reaction in Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS ONE* 8(3).

Guidugli DF, Castro AA, Atallah AN. 2000. Antibiotics for treating leptospirosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*,4.

Gulati S, Gulati A. Pulmonary manifestations of leptospirosis. *Lung India* 2012 Oct-Dec; 29(4): 347–353

Guterres A, Oliveira RC, Fernandes J, Dàndrea PS, Bonvicino CR, Bragagnolo C, Guimarães GD, Almada GL, Machado RR, Lavocat M, Elkhoury MR, Schrago CG, Lemos ERS. 2013. Phylogenetic analyses of the S segment from Jucituba hantavirus: Identification of two distinct lineages in *Oligoryzomys nigripes*. *Infection, Genetics and evolution* 18, 262-268.

Haas CS, Lehne W, Muck P, Boehm A. 2013 Acute kidney injury and thrombocytopenic fever- consider the infrequent causes. *American Journal of Emergency Medicine* 31 – 541.

Hardestam J, Petterson , Ahlm C et al. 2008. Antiviral effect of human saliva against hantavirus. *J Med Virol* 80, 2122-6.

Hardestam J, Lundkvist A, Klingstrom J. 2009. Sensitivity of Andes hantavirus to antiviral effect of human saliva. *Emer Infect Dis* 15,1140-1142.

Himsworth CG. *Vector –borne and zoonotic diseases* 2013.

Hindrichsen S. A Medeiros de Andrade, J Clement, H Leirs, P McKenna, P Matthys, G H Neild 1993. Hantavirus infection in Brazilian patients from Recife with suspected leptospirosis *The Lancet* 341 (8836):50 .

Hindrichsen S. 2004. Leptospirose e doença por hantavírus: relato de dez casos.

Hinojosa P M, Villagra C E, *et al.* 2006. [Identification of infectious agents in cases suspicious of Hantavirus infection but with negative serology]. *Rev Med Chil* 134, 3, 332-8

Hooper, J.W., Josleyn, M., Ballantyne, J., Brocato, R. 2013. A novel Sin Nombre virus DNA vaccine and its inclusion in a candidate pan-hantavirus vaccine against hantavirus pulmonary syndrome (HPS) and hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). *Vaccine* 31 (40), 4314–4321.

Johnson, A.M., Bowen, M.D., Ksiazek, T.G., Williams, R.J., Bryan, R.T., Mills, J.N., Peters, C.J., Nichol, S.T., 1997. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* 238(1), 115–127

Johnson, A.M., de Souza, L.T., Ferreira, I.B., Pereira, L.E., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Peters, C.J., Nichol, S.T., 1999. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. *J. Med. Virol.* 59 (4), 527–535.

Jonsson CB, Figueiredo LT, Vapalahti O. 2012. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 23:421-441.

Katz G, Williams RJ, Burt MS, de Souza LTM, Pereira LE, Mills JN, Suzuki A, Ferreira IB, Souza RP, Alves VAF, Bravo JS, Yates TL, Meyer R, Shieh W-J, Ksiazek TG, Zaki SR, Khan AS, Peters CJ. 2001. Hantavirus pulmonary syndrome in the state of São Paulo, Brazil, 1993-1998. *Vector Borne and zoonotic diseases* 1(3).

Ketai LH, Williamsom MR, Telepak RJ et al. 1994 Hantavirus pulmonary syndrome: radiographic findings in 16 patients. *Radiology* 191:665-668.

Ko AI, Galvao RM, Ribeiro Dourado CM, Johnson WDJr, Riley LW. 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 354:820-825.

Koury MC, Simpson AJG, Pena SDJ, Romanha AJ, Harskeer RA, Vago AR, Caballero OL, Oliveira MAAO, 2003. Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 127–135

Kudesia G, Christie P, Walker E, Pinkerton I. 1988. Dual infection leptospira and hantavirus. *The Lancet*.

Kupek E, Faversani MC, Philippi JM. 2000. The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianopolis, Brazil 1991–1996. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 4: 131–134.

Laguardia J, Domingues CMA, Carvalho C, Lauerman CR, Macário E, Glatt R. 2004. Sistema de Informação de Agravos ( SINAN ): desafios no desenvolvimento de um sistema de informação em saúde 13(3):135-146.

Lamas, CC; Oliveira, RC; Bóia, MN; Kirsten, AH; Silva, AP; Maduro, R; Bragagnolo, C; Bezerra, L; Lemos, ERS. 2006. Hantavirus infection in HIV positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil: a seroprevalence study. *Braz J Infect Dis* 2013; 17(1) : 120-121.

Lamas CC, Oliveira R, Silva RG, Vicente LHB, Almeida EB, Lemos ERS, Bóia MN. 2013. Letter to the editor: Hantavirus infection in HIV positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil: a seroprevalence study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 7 (1).

Lemos RS, Alves-Correa AA, Oliveira RC, Rozental T, Pereira MM, Schatzmayr HG. 2003. Serologic evidence of hantavirus infection in patients from Rio de Janeiro with suspected leptospirosis. In: XIV Encontro Nacional de Virologia, 2003, Florianópolis. *Virus reviews & research. Sociedade Brasileira de Virologia* 8:96 – 97

Levett PN. *Leptospirosis Clinical microbiology reviews*. 2001, 14: 296–326.

Levett PN. Sequence-Based Typing of *Leptospira* : Epidemiology in the Genomic Era. *PLoS Negl Trop Dis*. 1:e120, 2007.

Levis, S.C., Briggiler, A.M., Cacase, M., Peters, C.J., Ksiazek, T.G., Cortés, J., Lázaro, M.E., Resa, A., Rollin, P.E., Pinheiro, F.P., Enria, D.E., 1995. Emergence of hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 2.

Levis S, Morzunov S, Rowe J et al. 1998. Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *J Infect Dis* 177: 529-538.

Lima DM, Sabino-Santos Junior G, Oliveira AC, Fontes RM, Colares JK, Araujo FM, Cavalcanti LP, da Fonseca BA, Figueiredo LT, Pompeu MM 2011. Hantavirus infection in suspected dengue cases from State of Ceara, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44 (6), 795–796.

Limongi JE, Moreira FG, Peres JB, Suzuki A, Ferreira IB, Souza RP, Pinto RM, Pereira LE 2013. Serological survey of hantavirus in rodents in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 55 (3.).

Luna EJA. 2002. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. *Rev. Bras. Epidemiol.* 5 (3).

MacNeil A, Comer JA, Ksiaszek TG. 2010. Sin nombre virus-specific immunoglobulin M and G kinetics in hantavirus pulmonary syndrome and the role played by serologic responses in predicting disease outcome. *J Infect Dis* 202:242-6.

Maes P, Clement J, Van Ranst M. 2009. Recent approaches in hantavirus vaccine development. *Expert Rev Vaccines*.8:67-76.

Mandell, Douglas, and Bennett`s. 2010. Principles and practice of infectious diseases 7th e. volume 2, Churchill Livingstone Elsevier ,USA.

Manson`s 2009. Tropical Diseases 22th e. Chapter 70, Saunders Elsevier.

Marotto, P. C. F., Nascimento, C. M. R., Eluf-Neto, J., Marotto, M. S., Andrade, L., Sztajn bok, J. & Seguro, A. C.1999.Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality.*Clin Infect Dis* 29,1561–1563.

Marchiori E, Lourenço S, Setúbal S, Zanetti G, Gasparetto DT , Hochhegger B. 2011. Clinical and imaging manifestations of Hemorrhagic pulmonary leptospirosis: state of the art review. *Lung*189:1-9.

Marotto PC, Marotto MS, Santos DL, Souza TN, Seguro AC, 1997. Outcome of leptospirosis in children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 307–310.

Martinez, V.P., Bellomo, C., San Juan, J., Pinna, D., Forlenza, R., Elder, M., Padula, P.J. 2005. Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerg. Infect. Dis.* 11 (12),1848–1853.

Medronho RA. 2009. *Epidemiologia*. Rio de Janeiro: Atheneu, Brasil, capítulo 5.

Mertz, G.J., Hjelle, B., Crowley, M., Iwamoto, G., Tomicic, V., Vial, P.A. 2006. Diagnosis and treatment of new world hantavirus infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19 (5),437–442.

Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica Brasília,2002.

Ministério da Saúde (MS). Plano Nacional de Saúde 2012-2015.

MMWR Morb. 1993. Mortal. Weekly Rep 1994; 43. Hantavirus Pulmonary Syndrome United States.

Moolenaar RL, Dalton C, Lipman HB et al. 1995. Clinical features that differentiate hantavirus pulmonary syndrome from three other acute respiratory illnesses. Clin Infect Dis 21, 643-649.

Moreli, M.L., Sousa, R.L., Figueiredo, L.T., 2004. Detection of Brazilian hantavirus by reverse transcription polymerase chain reaction amplification of N gene inpatients with hantavirus cardiopulmonary syndrome. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (6), 633-638.

Mori M, Rothman AL, Kurane I et al. High levels of cytokine-producing cells in the lung tissues of patients with fatal hantavirus pulmonary syndrome. J Infect Dis. 179:295-302, 1999.

MS/SVS - Ministério da Saúde/Serviço de Vigilância em Saúde. Boletim eletrônico epidemiológico. Junho 2009

MS/SVS - Ministério da Saúde/Serviço de Vigilância em Saúde. Boletim eletrônico epidemiológico. 2 de abril 2010.

Musso D and La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. JOURNAL of Microbiology, Immunology and Infection (2013) 46, 245-252.

Nally JE, Chantranuwat C, Wu XY, Fishbein MC, Pereira MM, Da Silva JJ, Blanco DR & Lovett MA 2004. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. Am. J. Pathol. 164:1115-1127



Nicodemo AC, Duarte MI, Alves VA, Takakura CF, Santos RT, Nicodemo EL 1997. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. *Am J Trop Med Hyg* 56:181-187.

Nichol ST. Bunyaviruses. In Knipe DM, Howley PM(Eds) *Fields Virology*. Lippincott Williams&Wilkins , Philadelphia, p.1603-1634, 2001.

Nolte KB, Foucar K, Feddersen RM, Zumwalt RE, Miller GL, Khan AS. 1995. Hantavirus pulmonary syndrome in the United States: a pathological description of a disease caused by a new agent. *Pediatr Infect Dis J*. 14(12): 1108–1110.

Oliveira RC, Teixeira BR, Mello FCA, Pereira AP, Duarte AS, Bonaldo MC, Bonvicino CR, D'Andrea PS, Lemos ERS. Genetic characterization of a Juquitiba-like viral lineage in *Oligoryzomys nigripes* in Rio de Janeiro. *Acta Tropica* 112(2009) 212-218.

Oliveira RC, Padula PJ, Gomes R, Martinez VP, Bellomo C, Bonvicino CR, Freire e Lima DI, Bragagnolo C, Caldas AC, D'Andrea PS, de Lemos ER 2011. Genetic characterization of hantaviruses associated with sigmodontine rodents in an endemic area for hantavirus pulmonary syndrome in southern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 301-314.

Panaphut, T., Domrongkitchaiporn, S., Vibhagool, A., Thinkamrop, B. & Susaengrat, W. 2003. Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis. *Clin Infect Dis* 36, 1507–1513.

Pereira LE (2006) Estudo ecoepidemiológico de hantavírus em roedores das regiões da mata atlântica e cerrado do Brasil. São Paulo: Tese de Doutorado Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo: 165.

Pereira, M. M., Andrade, J., Marchevsky, R. S. & Ribeiro dos Santos, R. 1998. Morphological characterization of lung and kidney lesions in C3H/HeJ mice infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae: defect of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells are prognosticators of the disease progression. *Exp Toxicol Pathol* 50, 191–198.

Pereira MM & Andrade I, 1988. Epidemiological aspects of leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Search for leptospirosis and specific antibodies in rodents. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82:768-770.

Pereira M M, Andrade J. 1990. Human leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil: a serological and epidemiological study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85 (1): 47-52.

Pereira da Silva JJ, Dalston MO, De Carvalho JEM., Setúbal S, De Oliveira JMC & Pereira MM 2002. Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. *Revista Soc. Bras. Med. Tropical* 35:395-399

Pereira GW, Teixeira AM, Souza MS, Braga AD, Santos Junior Jr GS, Figueiredo GG, Figueiredo LT, Borges AA 2012. Prevalence of serum anti-bodies to hantavirus in a rural population from the Southern State of Santa Catarina, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45 (1), 117–119.

Peters CJ. 1998. Hantavirus Pulmonary Syndrome in the Americas. In Sheld WM, Craig WA, Hughes JM(eds) *Emerging InfectiousII*. ASM Press, Washington, p.15-50.

Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. 1996. “Hantaviruses: genome structure, expression and evolution,” *Journal of General Virology* 77 (11) 2677–2687.

Raboni SM, Levi S, Rosa Es et al. 2007. Hantavirus infection in Brazil: development and evaluation of an enzyme immunoassay and immunoblotting based on N recombinant protein. *Diag Microbiol Infect Dis.*58:89-97.

Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RD, Santana FS, Mohr S, Melendez AX, Queiroz A, Santos AC, Ravines RR, Tassinari WS, Carvalho MS, Reis MG, Ko AI. 2008. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis* 2: 228.

Rollin Pe, Knust B. 2013. Twenty years summary of surveillance of human hantavirus infection, United States. *Emerging Infectious Diseases.*19 (12).

Romero EC, Bernardo CC, Yasuda PH. 2003. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 45:245–248.

Rosa ES, Mills JN, Padula PJ, Elkhoury MR, Ksiazek TG, Mendes WS, Santos ED, Araujo, GC, Martinez VP, Rosa JF, Edelstein A, Vasconcelos PF, 2005. Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. *Vector Borne Zoonot. Dis.* 5 (1), 11–19.

Rothman JA, Potts LA Clinical and laboratory features that distinguished dengue from other febrile illnesses in endemic population. *Trop Med Int Health* 2008.

Saggiaro, F.P., Rossi, M.A., Duarte, M.I., Martin, C.C., Alves, V.A., Moreli, M.L., Figueiredo, L.T., Moreira, J.E., Borges, A.A., Neder, L. 2007. Hantavirus infection induces a typical myocarditis that may be responsible for myocardial depression and shock in hantavirus pulmonary syndrome. *J. Infect. Dis* 195 (10) 1541–1549.

Dos Santos VM, Rocha de Sá DA, Turra TZ, Borges NMF, Nascimento UM, Damasceno EAM. 2009. Hantavirus pulmonary syndrome in Brasilia periphery: a diagnostic challenge. *J Infect Dev Ctries* 3(8):639-643.

Santos IO, Figueiredo GG, Figueiredo LT, Azevedo MR, Novo NF, Vaz CA. 2013. Serologic survey of hantavirus in a rural population from the northern State of Mato Grosso, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46 (1): 30–33.

Schmaljohn C, Hjelle B. 1997. “Hantaviruses: a global disease problem,” *Emerging Infectious Diseases* 3 (2) 95–104.

Schmaljohn CS, Hooper JA. 2001. Bunyaviridae: the virus and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds), *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1581-1602.

Schmaljohn C. 2009. Vaccines for hantaviruses. *Vaccine*. 5;27 Suppl 4:D61-4.

Segura, E. R., Ganoza, C. A., Campos, K., Ricaldi, J. N., Torres, S., Silva, H., Céspedes, M. J., Matthias, M. A, Swancutt, M. A. et al. 2005. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin Infect Dis* 40, 343–351.

Sestaro C, Castanheira Fernandes SR, Vileta RS et al. 1999. Hantavirus pulmonary syndrome: an alert to latin american countries. *Braz J Infect Dis*.3:203-214.

Shrivastava-Ranjan P, Rollin PE, Spiropoulou CF. 2010. Andes virus disrupts the endothelial cell barrier by induction of VEGF and down-regulation of VE-cadherin. *J Virol*.

Silva MV. 1997 Hantavirus Pulmonary Syndrome: report of the first three cases in Sao Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 39: 231-234.

Silva JJ, Dalston MO, Carvalho JE, Setubal S, Oliveira JM, Pereira MM. (2002). Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35, 395–399

Sion ML, Hatziliolis AI, Amennaka MC, Topulis EN, Kalampalika D, Mikoudi KD. Acute renal failure caused by leptospirosis and hantavirus infection in an urban hospital. *European Journal of Internal Medicine* 13(220) 264-268.

Simmons JH, Riley LK. 2002. Hantavirus: an overview. *Comp Med* 52:97-110.

Sobreira M, Souza GT, Moreli ML, Borges AA, Morais FA, Figueiredo LTM, Almeida AMP 2008. A serosurvey for hantavirus infection in wild rodents from the states of Rio de Janeiro and Pernambuco, Brazil. *Acta tropica* 107: 150–152.

Souza WM, Machado AM, Disner GR, Boff E, Machado AR, Padua M, Figueiredo LT, Miranda GB. 2012. Antibody levels to hantavirus in inhabitants of western Santa Catarina State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 54(4), 193–196.

Souza WM, Machado AM, Figueiredo LT, Boff E. 2011. Serosurvey of hantavirus infection in humans in the border region between Brazil and Argentina. *Rev. Soc.Bras. Med. Trop* 44 (2), 131–135.

Spiropoulou, CF, Morzunov, S, Feldmann, H, Sanchez, A, Peters, CJ, Nicho, STI. 1994. Genome Structure and Variability of a Virus Causing Hantavirus Pulmonary Syndrome *Virology*. 200:2, 715–723.

Sudhir U, Venkatachalaiah RK, Kumar T A, Rao MY, Kempegowda P. Significance of serum procalcitonin in sepsis. *Indian Journal of Critical Care Medicine* January-March 2011 Vol 15 Issue 1

Suzuki, A., Bisordi, I., Levis, S., Garcia, J., Pereira, L.E., Souza, R.P., Sugahara, T.K., Pini,N., Enria, D., Souza, L.T. 2004. Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil.*Emerg. Infect. Dis.* 10 (12), 2127–2134.

Tavares, W.; Marinho, L.A.C. Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. 2 edição. Rio de Janeiro: Atheneu, Brasil, 2007 pagina 191 e 1192;

Travassos da Rosa, E.S., Medeiros, D.B., Nunes, M.R., Simith, D.B., de SouzaPereira, A., Elkhoury, M.R., Lavocat, M., Marques, A.A., Via, A.V., D’Andrea,P., Bonvicino, C.R., Lemos, E.R., Vasconcelos, P.F. 2011. Pygmy rice rat aspotential host of Castelo dos Sonhos hantavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (8),1527–1530.

Travassos da Rosa, E.S., Sampaio de Lemos, E.R., de Almeida Medeiros, D.B., Simith,D.B., de Souza Pereira, A., Elkhoury, M.R., Mendes, W.S., Vidigal, J.R., de Oliveira,R.C., D’Andrea, P.S., Bonvicino, C.R., Cruz, A.C., Nunes, M.R., da Costa Vasconcelos,P.F., 2010. Hantaviruses and hantavirus pulmonary syndrome, Maranhao, Brazil.*Emerg. Infect. Dis.* 16 (12), 1952–1955.

Trevejo RT, Rigau-Perez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin-Gonzalez C, Amador JJJ, de los Reyes O, Gonzalez A, Zaki SR, Shieh WJ, McLean RG, Nasci RS, Weyant RS, Bolin CA, Bragg SL, Perkins BA, Spiegel RA 1995. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary haemorrhage - Nicaragua. *J Infect Dis* 178:1457–1463.

Vial PA, Valdivieso F, Mertz G et al. 2006. Incubation period of hantavirus cardiopulmonary syndrome. *Emerg Infect Dis.* 12:1271-1273.

Vial, P.A., Valdivieso, F., Ferres, M., Riquelme, R., Rioseco, M.L., Calvo, M., Castillo, C., Diaz, R., Scholz, L., Cuiza, A., Belmar, E., Hernandez, C., Martinez, J., Lee, S.J., Mertz, G.J. 2013. Hantavirus Study Group in C. High-dose intravenous methylpred-nisolone for hantavirus cardiopulmonary syndrome in Chile: a double-blind, randomized controlled clinical trial. *Clin. Infect. Dis.* 57 (7), 943–951.

Vinetz JM , Wilcox BA, Aguirre A, Gollin LX, Katz AR, Fujioka RS, Maly K, Horwitz P and Chang H. *EcoHealth* 2, 291-306, 2005.

Watt G, Tuazon ML, Santiago E, Padre LA, Chalubaquib C, Ranoa C, Laughlin LW. 1988. Placebo-controlled trial of intravenous penicilin for severe and late leptospirosis. *Lancet* 27:433-435.

Wells RM, Estani SS, Yadon ZE. An unusual hantavirus outbreak in Southern Argentina: person-to-person transmission. *Emerg Infeci Dis* 1997;3:171-174.

WHO 2003. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control.

[www.portal.saude.gov.br](http://www.portal.saude.gov.br)

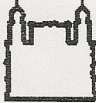


Yersin C, Bovet P, Merien F, Clement J, Laille M, Ranst MV, Perolat P. 2000. Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94, 71-76.

Young JC, Hansen GR, Graves TK et al. 2000. The incubation period of hantavirus pulmonary syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 62:714-717.

Zaki, SR, Greer PW, Coffield, LM, Goldsmith CS, Nolte KB, Foucar K, Feddersen RM, Zumwalt EM, Miller GL, Khan AS, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST, Mahy BWJ, Peters CJ. 1995. Hantavirus pulmonary syndrome Pathogenesis of an Emerging Infectious Disease. *Am J Pathol* 146(3): 552–579.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1: Ficha de solicitação de exames para Leptospirose LRNL.

 <p>Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz</p>	 <p>Secretaria de Estado de Saúde Laboratório Central Noel Nutels Rua do Resende, 118 – Centro Fones: (21) 2252-4000 / 2232-5767</p>	 <p>SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE</p>
Centro de Ref. Nac. para Leptospirose Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz Av. Brasil, 4365 – Mangueiras Pavilhão Rocha Lima, 3º andar, salas 302/304 Fones: (21) 2598-4277/4278/4283 Ramais: 302/304; Ramal Fax: 333	Secretaria Municipal de Saúde Inst. de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman Av. Bartolomeu de Gusmão, 120 / S. Cristóvão Tel: (21) 2254-2100 ramal: 216 / 211	

**FICHA DE SOLICITAÇÃO DE EXAMES PARA LEPTOSPIROSE**

**IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE**

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) masculino ( ) feminino  
Profissão: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_  
Zona: ( ) rural ( ) urbana Município: \_\_\_\_\_ U.F.: \_\_\_\_\_

**DADOS DO SOLICITANTE**

Unidade de Saúde: \_\_\_\_\_ Tel: ( ) \_\_\_\_\_  
Nº. Laboratório de Origem: \_\_\_\_\_ Nº. Prontuário: \_\_\_\_\_  
Nome do Médico: \_\_\_\_\_ CRM: \_\_\_\_\_  
Exames Solicitados: ( ) Hemocultura ( ) Macro-Aglutinação ( ) Micro-Aglutinação  
( ) PCR Outros: \_\_\_\_\_

**DADOS CLÍNICOS**

Hipótese Diagnóstica: \_\_\_\_\_ Início dos Sintomas: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Tratamento antes da coleta de material para Hemocultura ou Sorologia? ( ) Antibiótico ( ) Corticosteróide  
Sinais e Sintomas: ( ) Febre ( ) Congestão Conjuntival ( ) Mialgia  
( ) Exantema ( ) Hemorragia Gastrointestinal ( ) Meningismo  
( ) Alteração respiratória ( ) Oligúria ou Anúria ( ) Icterícia  
( ) Hemorragia Pulmonar ( ) Outros sinais Hemorrágicos ( ) Arritmias  
( ) Outros, Quais? \_\_\_\_\_  
OBS: \_\_\_\_\_

**HISTÓRIA EPIDEMIOLÓGICA**

Situações ocorridas nos 20 / 30 dias que antecederam os primeiros sintomas:  
Provável local de infecção: ( ) Domicílio ( ) Trabalho ( ) Via Pública ( ) Lazer  
( ) Imersão prolongada em água e lama de enchente.  
( ) Banho de rio, córrego, lago, cachoeira.  
( ) Participação de limpeza de caixa d'água. Outras Observações: \_\_\_\_\_  
( ) Participação em limpeza em fossas ou esgoto.  
( ) Presença de animais no domicílio ou peridomicílio.

Anexo 2: Fluxograma para diagnóstico clínico de SPH no primeiro atendimento emergencial

