

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR HANTAVIRUS EM AMOSTRAS
HUMANAS E DE ROEDORES SILVESTRES E SINANTRÓPICOS NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

LIANA STRECHT PEREIRA

Rio de Janeiro

Abril de 2014

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR HANTAVIRUS EM AMOSTRAS
HUMANAS E DE ROEDORES SILVESTRES E SINANTRÓPICOS NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

por

LIANA STRECHT PEREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Diagnóstico, epidemiologia e controle de doenças infecciosas e parasitárias.

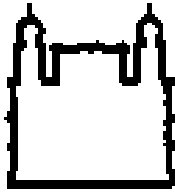
Orientadora: Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos.

Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses – LHR.

Departamento de Virologia/IOC

Rio de Janeiro

Abril, 2014



Instituto Oswaldo Cruz

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR HANTAVIRUS EM AMOSTRAS
HUMANAS E DE ROEDORES SILVESTRES E SINANTRÓPICOS NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

ORIENTADORA: Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos

Aprovada em: 25/04/2014

Banca Examinadora:

Dra. Flávia Barreto dos Santos – IOC/ FIOCRUZ

Dra. Rosana Gentile – IOC/FIOCRUZ

Dra. Cristiane Lamas (Revisora) – IPEC/FIOCRUZ

Dra. Renata Carvalho de Oliveira Pires dos Santos (Suplente) - IOC/FIOCRUZ

Dr. Paulo Sérgio D`Andrea (Suplente) – IOC/FIOCRUZ

RIO DE JANEIRO

2014

iii

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus por ter me permitido chegar até aqui. Por ter me guiado e não ter deixado o cansaço me vencer, mas principalmente por manter a minha fé mais forte que qualquer problema!

À minha orientadora, Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos, por me fazer acreditar que todo o nosso esforço e trabalho daria certo. Pela estimada orientação, ensinamentos e atenção constantes. “Dra. Elba, obrigada pelo acolhimento e por acreditar em mim; sem seu cuidado e orientação, esse sonho não seria realizado”.

Ao meu amado marido, Fabio Regis, que me apoiou em toda essa jornada incansavelmente, me deu forças onde eu achava que já não existia. “Obrigada por me ouvir e consolar todas as vezes que me via perdida, seu apoio e conselhos me fizeram chegar onde estou! Te amo!”.

À toda a minha família, em especial minha irmã Raquel, meu pai Carlos, minha avó Taninha e minha madrinha Glória, por me amarem e me apoiarem nas minhas decisões.

À minha falecida mãe, eu dedico este trabalho, pois sei que onde quer que esteja, estará sempre do meu lado, me dando seu apoio incondicional e necessário! “Agradeço por ter feito de mim quem sou!”

Ao meu amigo e padrinho, Dr. Bernardo Rodrigues Teixeira, por todo o suporte estatístico e cartográfico. Além da cumplicidade e amizade, por todos os conselhos e “puxões de orelha” para que eu pudesse melhorar cada dia mais. “Obrigada por tudo nesses anos de parceria e por saber que posso contar com o seu apoio. Sua ajuda foi essencial para a concretização deste trabalho”.

À amiga Kerla, pelas horas incansáveis de trabalho que nos fizeram chegar até aqui, pelos sábados produtivos, por nosso banco de dados, mas principalmente pela sua força e esforço, que admiro e sigo como exemplo. Obrigada pela amizade. “Amiguinha, assim caminha a humanidade!”.

Aos amigos Luciana, Endiá, Michelle e Raphael, por me ajudarem sempre que precisei; sem a colaboração de vocês esse trabalho seria muito mais difícil e trabalhoso. Sem contar a amizade e os momentos de desabafo que foram muito importantes para eu seguir em frente.

À equipe de Hantavírus, do Laboratório Hantavírus e Rickettsioses, Renata Oliveira, Jorlan Fernandes e Alexandro Guterres, pelo apoio e contribuição neste trabalho, além da parceria na pesquisa de hantavírus.

À amiga Tatiana Rozental, pelo carinho e pelos conselhos em todos os momentos.

À toda equipe do Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Cristiane, Alexandra, Adonai, Angélica, Sotiris, Brena, obrigada por serem companheiros nesta jornada e pela agradável convivência.

Ao Laboratório de Biologia e parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios/ IOC, pela parceria de tantos anos e por estarem com as portas sempre abertas para ajudar.

Gostaria de reforçar o agradecimento a dois companheiros importantes da minha turma de mestrado e também de Laboratório, Jorlan Fernandes e Kerla Joeline, vocês foram imprescindíveis para que esse momento chegasse. Obrigada pela amizade de todos esses anos e também por fazer essa trajetória tão difícil, que foi o nosso mestrado, o mais agradável possível. “Conseguimos!”

Às amigas do mestrado que conquistei e que guardo com carinho, Carina Martins, Vivian Franco, José Joaquim, Nádia Rivas, Lyana Lima, Helena Medina, Natália Lanzarini, Dadade Xavier, Thaís Souza, Janaína Félix, Marjorie Lima, Ana Cláudia Terças, Carol Magalhães e Tayany de Deus, foi muito bom compartilhar esses momentos com vocês. “Todos vocês estão em meu coração!”.

À Coordenação do Programa de Medicina Tropical – IOC/FIOCRUZ pela oportunidade em realizar o curso de Mestrado Strictu Sensu em Medicina Tropical.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo suporte financeiro.

Ao Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, da Faculdade de Medicina da USP/ Ribeirão Preto, pelo fornecimento dos antígenos utilizados nos testes sorológicos desta dissertação e demais trabalhos realizados no laboratório.

À equipe do Laboratório Central Noel Nutels – LACEN/RJ, pelo apoio e colaboração para a execução deste trabalho, além do fornecimento das amostras.

Ao Laboratório de Flavivírus – IOC/FIOCRUZ, pelas análises realizadas.

À banca examinadora por ter aceitado prontamente o convite.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Breve Histórico.....	1
1.2- Etiologia.....	3
1.3- Epidemiologia e Ecologia.....	6
1.3.1- Transmissão.....	6
1.3.2- Distribuição Geográfica dos Hantavírus	7
1.3.3- Reservatórios.....	10
1.3.4- Distribuição de casos humanos no Brasil e Síndrome Pulmonar por Hantavírus no Rio de Janeiro.....	14
1.4- Aspectos Clínicos da Síndrome Pulmonar por Hantavírus.....	18
1.4.1- Manifestações Clínicas.....	18
1.4.2- Tratamento.....	19
1.5- Diagnóstico Laboratorial.....	20
1.6- Diagnóstico Diferencial e a Dengue.....	22
1.7- Controle e Prevenção.....	24
2- JUSTIFICATIVA.....	27
3- OBJETIVOS.....	28

3.1-	Objetivo Geral	28
3.2-	Objetivos específicos	28
4-	METODOLOGIA	29
4.1-	Área de Estudo	29
4.2-	Estudo com População de Roedores	30
4.2.1.	Caracterização da Pesquisa e das Áreas de Captura de Roedores.....	30
4.2.2.	Captura de Roedores.....	31
4.2.3.	Coleta de Material Biológico dos Roedores.....	32
4.2.4.	Considerações Éticas.....	33
4.3-	Estudo com a População Humana	33
4.3.1.	Caracterização da Pesquisa na População Humana e dos Municípios Estudados.....	33
4.3.2.	Critérios de Inclusão para Pesquisa de Hantavírus.....	33
4.3.3.	Considerações Éticas	35
4.4 –	Diagnóstico Laboratorial de Infecção por Hantavírus	35
4.4.1 –	Imunoensaio Enzimático (ELISA).....	35
4.4.1.1.	<i>Amostras Humanas</i>	35
4.4.1.2.	<i>Amostras de Roedores</i>	37
4.4.2 -	Técnicas Moleculares.....	37
4.4.2.1.	<i>Extração do RNA viral</i>	38
4.4.2.1.1.	Amostras Humanas.....	38
4.4.2.1.2.	Amostras de Roedores Silvestres.....	39

4.4.2.2. <i>Transcrição Reversa do RNA (RT) com Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)</i>	40
4.4.2.3. <i>Análise de DNA em gel de agarose</i>	41
4.4.2.4. <i>Purificação e Sequenciamento nucleotídico</i>	41
4.4.2.5. <i>Análise do Sequenciamento</i>	42
4.4.2.6. <i>Análise Filogenética</i>	43
4.5 – Análise Estatística	43
5 – RESULTADOS	44
5.1 – População Humana	44
5.1.1. Perfil da População.....	44
5.1.2. Testes Sorológicos e Moleculares para Hantavírus em Amostras Humanas.....	45
5.2 - População de Roedores	47
5.2.1. Caracterização dos Roedores Capturados.....	47
5.2.2. Testes Sorológicos para Hantavírus em Amostras de Roedores.....	49
5.2.3. Detecção do Genoma Viral e Análise Filogenética.....	50
6 - DISCUSSÃO	52
6.1 – Detecção da infecção por hantavírus em roedores do estado do Rio de Janeiro	52
6.2 – Detecção da infecção por hantavírus em amostras humanas IgM negativas para dengue no estado do Rio de Janeiro	55
7- CONCLUSÕES	59

8 - PERSPECTIVAS.....	60
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
10 - ANEXOS.....	82
10.1 – Registro de coleta de animais silvestres.....	82
10.2– Parecer do comitê de ética para licença de captura de animais silvestres.....	83
10.3 – Licença permanente do IBAMA para coletas de mamíferos silvestres....	84
.....	84
10.4 – Autorização de captura n°255/2006 CGFAU.....	86
10.5 – Licença para pesquisa em unidade de Conservação.....	87
10.6 – Ficha epidemiológica para casos suspeitos de dengue do LACEN.....	88
10.7 – Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FIOCRUZ.....	89

RESUMO

A síndrome pulmonar por hantavírus (SPH) tem sido registrada no Brasil desde 1993 e a transmissão para o homem ocorre através da inalação de partículas virais presentes em aerossóis de excretas de roedores infectados. No Brasil, nove genótipos virais caracterizados a partir de roedores e/ou humanos foram descritos, sendo seis comprovadamente patogênicos. Desde os primeiros registros, mais de 1600 casos humanos foram confirmados, com ampla distribuição entre a maioria dos estados brasileiros e alta taxa de letalidade. A SPH apresenta-se como doença febril aguda caracterizada pelo grave comprometimento cardiovascular e respiratório. Os pacientes podem exibir uma ampla variedade de manifestações clínicas, onde os sinais e sintomas podem ser confundidos com os de outras doenças. Assim é necessário o diagnóstico diferencial separando casos de SPH de outros agravos com manifestações clínicas semelhantes, como é o caso da dengue. Embora não existam relatos de casos humanos no estado do Rio de Janeiro, foram encontradas evidências sorológicas em humanos e confirmação de circulação de hantavírus patogênico entre roedores silvestres, mais especificamente, na espécie *Oligoryzomys nigripes*, no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, em Teresópolis. Neste cenário, este estudo teve como objetivos avaliar a infecção por hantavírus em amostras humanas e em amostras de roedores silvestres e sinantrópicos provenientes de diversos municípios fluminenses. Um total de 497 amostras de soro de pacientes negativos para dengue pelos testes sorológicos, cedidas pelo LACEN/RJ, provenientes de 25 municípios, e de 235 amostras de roedores provenientes de sete municípios, foram analisadas através do ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-hantavírus da classe IgM e IgG (ELISA IgM e IgG) e de testes moleculares. Cinco amostras de pacientes (1%) procedentes dos municípios de Valença, Vassouras e Nova Friburgo foram ELISA-IgM reativas. Um roedor (0,42%) da espécie *Oligoryzomys nigripes* ELISA-IgG foi reativo no município de Valença. A ausência de RNA nas amostras humanas impossibilitou a realização de testes moleculares para caracterização e identificação do vírus, porém na amostra do roedor reativo foi possível detectar a variante viral *Juquitiba* como responsável pela infecção deste espécime. Em conclusão, a identificação do hantavírus patogênico *Juquitiba* em roedores silvestres e a evidência sorológica de infecção em amostras humanas neste

estudo reforçam a importância e a necessidade de vigilância da SPH no estado do Rio de Janeiro.

ABSTRACT

Hantavirus pulmonary syndrome (HPS) has been registered in Brazil since 1993 and transmission to humans occurs through inhalation of viral particles present in aerosols from excreta of infected rodents. In Brazil, nine viral genotypes characterized from rodents and/or humans have been described, six of them pathogenic. Over 1.600 human cases were confirmed, with wide distribution among most Brazilian states and high lethality. Hantavirus pulmonary syndrome presents as an acute febrile illness characterized by severe cardiovascular and respiratory compromise. Patients may exhibit a wide variety of clinical manifestations, where signs and symptoms can be confused with other diseases. Thus the differential diagnosis of HPS is necessary from other illnesses with similar clinical manifestations, such as dengue. There are no reports of human cases in Rio de Janeiro state, until now, but serologic evidence in humans and confirmation of circulating pathogenic hantavirus among wild rodents in Parque Nacional da Serra dos Órgãos in Teresopolis, related to the rodent *Oligoryzomys nigripes* were found. In this scenario, this study aimed to evaluate hantavirus infection in human, wild and synanthropic rodents samples from different municipalities in Rio de Janeiro state. Serum samples from 497 dengue fever seronegative patients, from 25 municipalities provided by the LACEN/RJ, and 235 serum samples from rodents, from seven municipalities, were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay for detection of anti-hantavirus antibodies of IgM and IgG (IgM and IgG ELISA) and molecular tests. Five human samples, from Valença, Vassouras and Nova Friburgo municipalities, presented IgM antibodies against hantavirus. A rodent species *O. nigripes* was found to be ELISA-reactive for IgG in the city of Valença. The absence of RNA in human samples made it impossible to perform unable to achieve molecular tests for characterization and identification of the virus, but the sample of the reactive rodent made it possible to detect the variant viral Jucitiba. In conclusion, the identification of pathogenic *Jucitiba* hantavirus in wild rodents and serological evidence of infection in human samples in this study reinforce the importance and need for surveillance of HPS in the state of Rio de Janeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Microscopia eletrônica do Vírus Sin Nombre.....	4
Figura 1.2: Representação esquemática de hantavírus e micrografia da partícula viral..	5
Figura 1.3: Representação esquemática da replicação dos hantavírus.....	6
Figura 1.4: Número de casos, do ano de 2000 a 2013, da FHRS e da SPH no mundo e sua distribuição.....	8
Figura 1.5: Alguns hantavírus não-patogênicos e patogênicos das Américas e seus roedores reservatórios até o ano de 2010.....	9
Figura 1.6: Distribuição dos principais reservatórios de hantavírus da América do Sul.....	12
Figura 1.7: Distribuição dos principais reservatórios e seus hantavírus na América do Norte.....	13
Figura 1.8: Número de casos de Hantavirose no Brasil por unidade federada.....	15
Figura 1.9: Curso clínico da Síndrome Pulmonar por Hantavírus.....	19
Figura 1.10: Cinética antígeno e anticorpo nas infecções por Dengue.....	21
Figura 1.11: Radiografia de tórax do primeiro caso confirmado da síndrome pulmonar por hantavírus no Brasil.....	24
Figura 4.1: Mapa do Estado do Rio de Janeiro, Regiões de Governo, segundo Divisão Político-Administrativa.....	29
Figura 4.2: Municípios do estado do Rio de Janeiro onde foram coletadas amostras de roedores para a pesquisa de hantavírus.....	30
Figura 4.3: Armadilhas utilizadas na captura de roedores, na parte superior armadilha tipo Sherman e na parte inferior armadilha tipo Tomahawk.....	31

Figura 4.4: Coleta de amostras biológicas de roedores silvestres e laboratório de campo para pesquisa de hantavírus.....	32
Figura 4.5: Distribuição dos municípios com amostras humanas analisadas no estado do Rio de Janeiro para pa esquisa de infecção por hantavírus (janeiro de 2010 a junho de 2011)	35
Figura 4.6: Esquema de extração de RNA viral.....	39
Figura 5.1: Municípios do estado do Rio de Janeiro com amostras humanas sororreativas.....	47
Figura 5.2: Município do estado do Rio de Janeiro onde foi encontrado o roedor <i>O. nigripes</i> infectado.....	50
Figura 5.3: As relações filogenéticas entre hantavírus com base em uma análise bayesiana de distâncias genéticas geradas a partir de comparações de um fragmento de 903 nt das seqüências do gene da proteína do nucleocapsídeo.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Inquéritos sorológicos para investigação de hantavírus em amostras humanas realizados em diversos estados brasileiros.....	16
Tabela 5.1: Total de amostras humanas IgM negativas para dengue e a prevalência por município estudado do Estado do Rio de Janeiro.....	44
Tabela 5.2: Número de amostras por faixa etária e sexo em relação ao ano de coleta.....	45
Tabela 5.3: Cálculo da média, do desvio padrão, da mediana e os valores mínimo e máximo da idade dos pacientes em relação ao sexo das amostras humanas utilizadas no estudo.....	45
Tabela 5.4: Cálculo da média, do desvio padrão, da mediana e os valores mínimo e máximo do tempo decorrido entre os primeiros sintomas e a coleta de material para análise em relação ao sexo das amostras humanas utilizadas no estudo.....	45
Tabela 5.5: Amostras humanas reativas e seus dados epidemiológicos.....	46
Tabela 5.6: Relação número de roedores capturados por espécie e os municípios estudados do Estado do Rio de Janeiro.....	48
Tabela 5.7: Distribuição de fêmeas e machos por espécie e por municípios estudados do estado do Rio de Janeiro.....	49

1- INTRODUÇÃO

1.1- BREVE HISTÓRICO

A hantavirose é uma zoonose amplamente distribuída em todo o mundo e constitui um grande problema de saúde pública. É transmitida para o homem principalmente por roedores silvestres e seus agentes etiológicos são vírus do gênero *Hantavírus* pertencentes à família *Bunyaviridae*. Os hantavírus podem causar duas síndromes distintas conhecidas como: febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR) e a síndrome pulmonar por hantavírus (SPH).

A FHSR foi nomeada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para agrupar doenças infecciosas agudas com manifestações hemorrágicas e comprometimento renal (Schmaljohn et al., 1985; Jonsson, 2001). Seus primeiros relatos datam desde o século X na literatura chinesa (Lee et al., 1982b; Johnson 2001). Contudo, a hantavirose foi inicialmente reconhecida em 1951, durante a Guerra da Coreia (1950 – 1953), quando a doença acometeu mais de 3.000 soldados americanos provocando uma síndrome febril aguda com manifestação hemorrágica, com letalidade de 5 a 10% (Smadel, 1953; Shetty et al., 1954; Gajdusek, 1962).

O vírus foi identificado somente em 1976, quando foi possível a descrição como vírus *Hantaan* (HTNV), através de tecido de pulmão do roedor *Apodemus agrarius coreae*, proveniente da região rural da Coreia do Sul. Posteriormente, em 1978, a etiologia viral da doença foi confirmada a partir do isolamento do vírus de um roedor infectado experimentalmente (Lee et al., 1978).

Diante da identificação de um novo agente viral, diversos estudos foram realizados e, a partir da década de 1980, outros vírus antígenicamente relacionados ao vírus *Hantaan* foram identificados e isolados de roedores silvestres e sinantrópicos: vírus *Puumala* (PUUV), causador de nefropatia epidêmica na Europa, encontrado no roedor *Chlethrionomys glareolus* (Brummer-Korvenkontio et al., 1980); vírus *Seoul* (SEOV), identificado em 1982, isolado de roedores sinantrópicos do gênero *Rattus* na região urbana de Seoul na Coreia (Lee et al., 1982); e o vírus *Prospect Hill* (PHV), identificado em 1984 em roedores silvestres da espécie *Microtus pennsylvanicus*, capturados em Prospect Hill, Frederick, Maryland, EUA (Lee et al., 1985), sem evidência de infecção humana (Yanagihara et al., 1984).

Desde então, a FHSR tem sido notificada na Europa, África e Ásia, com uma incidência anual em torno de 150.000 casos, metade deles com ocorrência no território chinês (Lee, 1996; Song, 1999; Jonsson et al., 2010).

Em 1987, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (CITV) criou um novo gênero integrante da família *Bunyaviridae*, denominado assim de *Hantavirus*, no qual incluíam o vírus *Hantaan*, protótipo do gênero (McKee et al., 1991) além dos vírus *Seoul*, *Puumala* e *Prospect Hill* (Lee, 1988).

Somente em 1993, a presença de hantavírus patogênico para homem foi identificada nas Américas, como agente da emergente SPH nos Estados Unidos durante surto de desconhecida doença respiratória grave em índios da tribo Navajo na região de Four Corners, sudoeste dos Estados Unidos, em maio de 1993 (Nichol et al., 1993; CDC, 1993). Com a caracterização do vírus *Sin Nombre* (SNV) em amostras dos casos foi possível identificar pela primeira vez uma nova doença, causada por um novo genótipo de hantavírus, até então nunca descrito no mundo (Hjelle et al., 1994b; Zaki et al., 1996), embora evidências de ocorrência da doença tenham sido identificadas em estudos retrospectivos realizados posteriormente, como o de Frampton e colaboradores que demonstraram que, nos EUA, a SPH vem ocorrendo desde o ano de 1959 (Frampton et al., 1995). Desde então, diversos genótipos virais já foram identificados nos EUA, associados com SPH, como o vírus *Bayou* (BAYV), *Black Creek Canal* (BCCV), *Monongahela* (MGLV) e o *New York* (NYV), específicos de uma área geográfica característica e seus hospedeiros roedores (Childs et al., 1994; Peters, 1998).

No Brasil, os três primeiros casos clínicos da doença foram relatados na área rural do município de Jquitiba, estado de São Paulo, nos meses de novembro e dezembro de 1993 (Iversson et al., 1994; Vasconcelos et al., 1997). Assim como nos Estados Unidos, a SPH foi identificada pela primeira vez em 1993 e estudos realizados anteriormente já apontavam para a circulação do hantavírus no território brasileiro (LeDuc et al., 1984; 1985). Em 1983, mais especificamente, no estado do Pará, foi realizado o isolamento do primeiro hantavírus associado ao vírus *Seoul*, a partir de vísceras do roedor sinantrópico *Rattus norvegicus* (LeDuc et al., 1985). Posteriormente, em 1990, anticorpos específicos anti-vírus *Seoul* foram encontrados em pacientes diagnosticados com leptospirose na cidade de Recife, Pernambuco e anti-vírus *Hantaan* e *Puumala*, na cidade de São Paulo, São Paulo e na cidade de Paranaguá, Paraná (LeDuc, 1984; 1985; Iversson et al., 1994; Romano-Lieber et al., 1995).

Após a identificação nos Estados Unidos e no Brasil, a SPH passou a ser reconhecida, subsequentemente, em diversos países da América do Sul com a descrição de novos genótipos virais de hantavírus tanto em roedores silvestres quanto em humanos (Kruger et al., 2001).

A SPH também é denominada síndrome cardiopulmonar por hantavírus (SCPH) ou síndrome pulmonar e cardiovascular (SPCVH), considerando que estudos realizados posteriormente comprovaram o importante comprometimento cardíaco (Peters et al., 1999; Figueiredo et al., 2001; Ferreira, 2003; Saggiaro et al., 2007).

Caracterizada por apresentar, em sua grande maioria, roedores silvestres como seus hospedeiros naturais, recentemente novos hantavírus têm sido detectados também em espécies de mussaranhos e toupeiras na Eurásia, África, EUA e China (Carey et al., 1971; Zeller et al., 1989; Klempa et al., 2007; Song et al., 2007a; Arai et al., 2007; Kang et al., 2009a; 2010; Guo et al., 2013). Nos últimos três anos, estudos desenvolvidos em Serra Leoa, na África, e na Costa do Marfim, na África Ocidental, têm identificado a presença de novos hantavírus chamados *Magboi* e *Mouyassué*, em morcegos da espécie *Nycteris hispida* e *Neoromicia nanus*, respectivamente. Na China, outros hantavírus foram identificados em morcegos e insetívoros, nomeados *Huangpi*, *Lianghe*, *Longquan* e *Yakeshi*, o que corrobora com a necessidade de maiores estudos e informações sobre os hantavírus e seus reservatórios (Weiss et al., 2012; Sumibcay et al., 2012; Guo et al., 2013).

1.2 - ETIOLOGIA

Pertencentes à família *Bunyaviridae*, atualmente compreendendo mais de 300 vírus distintos, os hantavírus formam um gênero distinto, no qual diferentemente dos outros quatro membros da família que são arbovírus, - *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* e *Tospovirus* -, não são transmitidos por vetores artrópodes (Nichol et al., 2005; Schmaljohn e Nichol, 2007).

A taxonomia dos hantavírus é bem complexa e, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (CITV), são classificados, atualmente, 24 espécies de hantavírus (Elliot et al., 2000; Fauquet et al., 2005).

Assim como outros Bunyavírus, os hantavírus apresentam-se morfológicamente esféricos ou ovóides, com suas partículas medindo em torno de 80 a 120 nm de

diâmetro, embora possam apresentar partículas com forma alongada chegando a 170 nm ou mais (Figura 1.1). São vírus envelopados por dupla camada lipídica na qual estão inseridas duas glicoproteínas, Gn e Gc, com aproximadamente 70kDa e 50kDa de peso molecular, respectivamente, que compõem as espículas do envelope (Schmaljohn & Patterson, 1991; Nichol, 2001; Lednicky, 2003; Schmaljohn & Nichol, 2007).

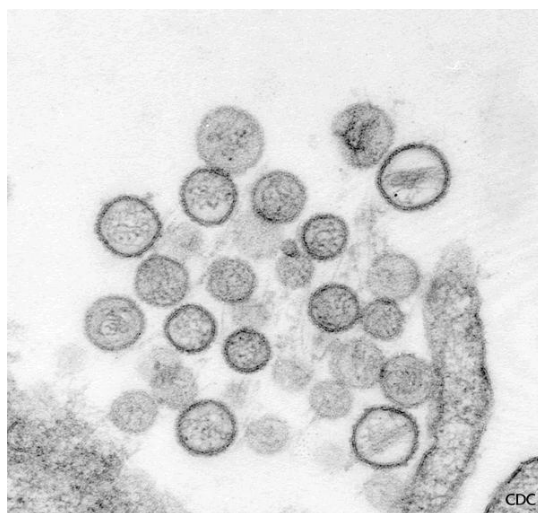


Figura 1.1: Microscopia eletrônica do Vírus Sin Nombre. Fonte: www.cdc.gov/.../hanta/hps/noframes/hpsem.htm, 2006.

Seu genoma trissegmentado é composto de RNA fita simples de polaridade negativa; (i) o segmento grande (L) constituído por 6530-6550 nucleotídeos que codifica a polimerase viral que tem função de transcriptase/replicase viral, (ii) o segmento médio (M) com 3613-3707 nucleotídeos, que codifica uma poliproteína clivada de modo a formar as duas glicoproteínas virais do envelope, Gn e Gc, e (iii) o segmento pequeno (S) com 1696-2083 nucleotídeos, que codifica a proteína do nucleocápside (N) (Figura 1.2) (Elliot et al., 1991; Nichol et al., 1996; Plyusnin et al., 1996; 2002; Bi Z et al., 2008).

Nas extremidades de cada um dos segmentos existem regiões não codificadoras (NCR) que são conservadas, com aproximadamente 23 nucleotídeos, que ao se complementarem, através do pareamento das bases, formam estruturas com formato de raquete chamadas de “panhandle”, conferindo o aspecto circular do RNA, peculiar da família *Bunyaviridae* (Plyusnin et al, 1996; Jonsson & Schmaljohn, 2001; Hepojoki et al., 2012).

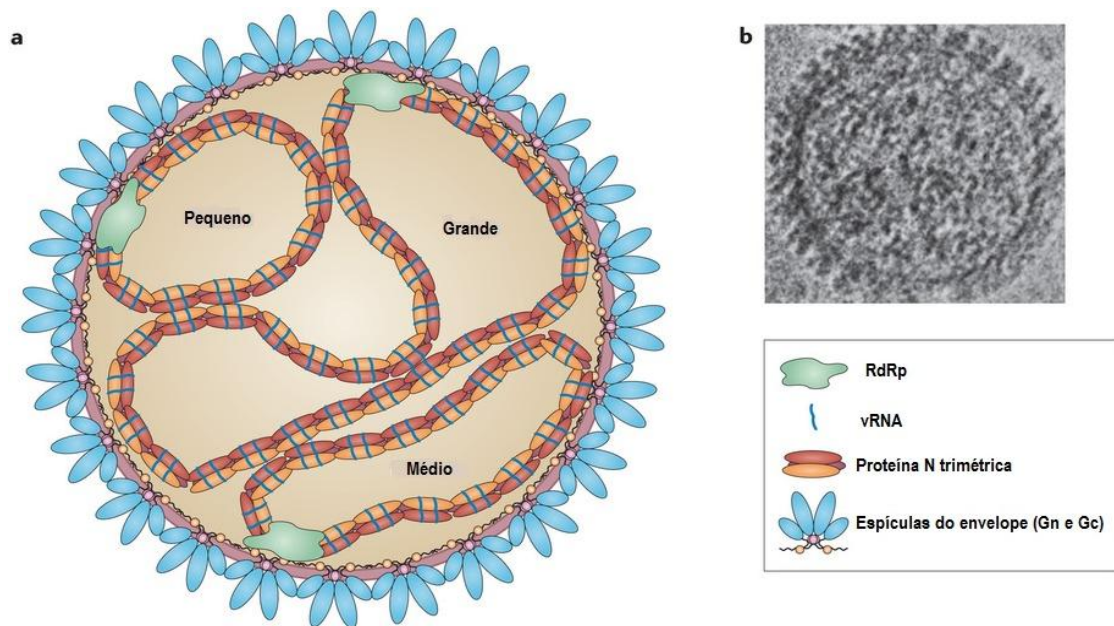


Figura 1.2: a) Representação esquemática de hantavírus e b) micrografia da partícula viral. Adaptado de: Vaheri et al., 2013.

Semelhante aos outros vírus da família *Bunyaviridae*, a replicação dos hantavírus ocorre exclusivamente no citoplasma das células endoteliais do hospedeiro. Após a penetração do vírus por acoplamento das proteínas de envelope (Gn e Gc) a receptores celulares específicos da célula hospedeira do tipo integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$, ocorre a endocitose. Algumas lectinas também podem promover a entrada das partículas virais (Ogino et al., 1999). A liberação do nucleocapsídeo no citoplasma ocorre pela fusão do vírion com a membrana endossomal, dependente de valores baixos de pH, iniciando-se posteriormente a transcrição dos genes virais para a produção das proteínas que irão constituir parte dos novos vírions (Vapalahti et al., 1995; Ravkov et al., 1998; Kaukinen et al., 2001; Jin et al., 2002).

A RNA polimerase viral é ativada e irá transcrever o RNA genômico em RNA mensageiro (RNAm). Posteriormente ocorrerá a tradução das proteínas que irão constituir os novos vírions, seguido de replicação do genoma e amplificação da síntese dos RNAm que irão compor o genoma trissegmentado (Elliot 1990; Schmaljohn & Hooper 2001; Hepojoki et al.; 2012). Essas partículas recém-formadas são, então, transportadas para vesículas secretoras da membrana citoplasmática e liberadas por exocitose (Plyusnin et al., 1996; Gavrilovskaya et al., 1998; 1999; Kaukinen et al., 2001) (Figura 1.3).

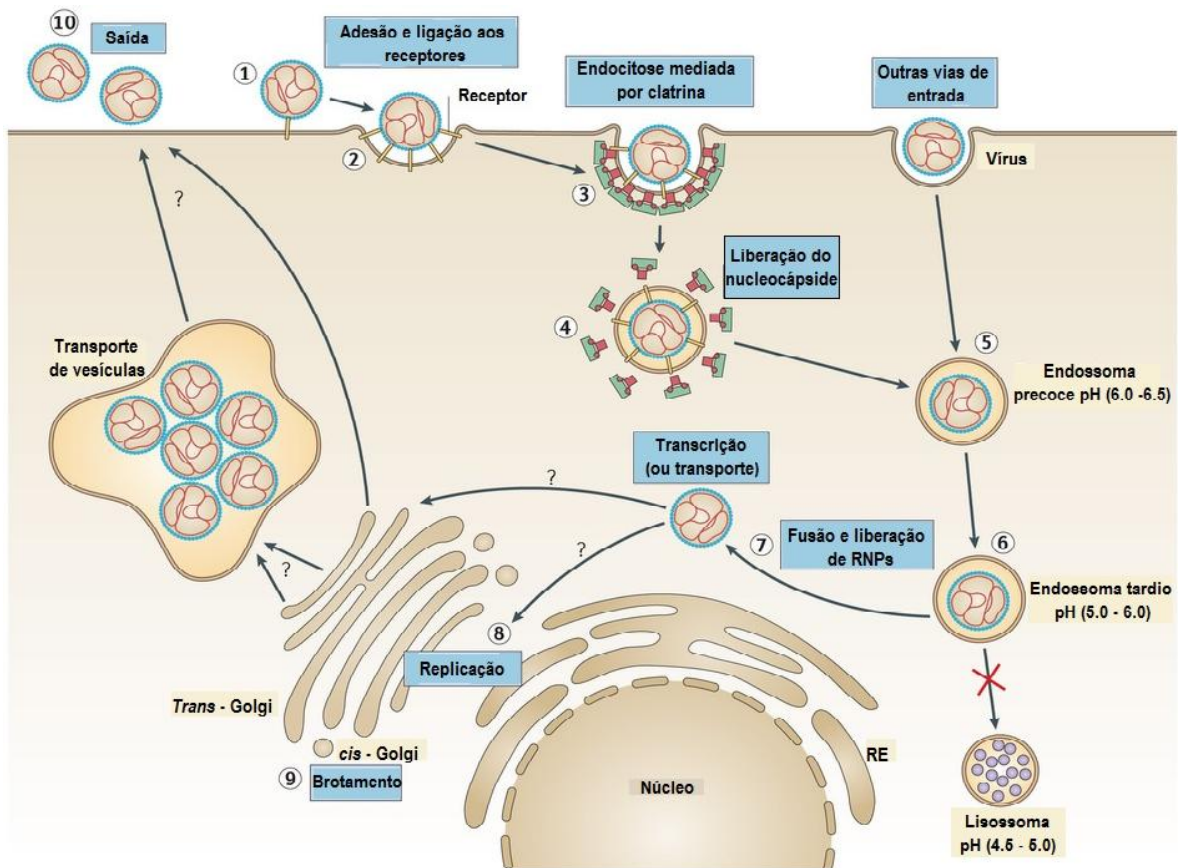


Figura 1.3: Representação esquemática da replicação dos hantavírus. 1) O vírus se liga a um receptor na superfície da célula; 2) Este evento induz a sinalização de endocitose; 3) Endocitose mediada por receptores e englobamento do vírus (outras vias de endocitose já foram observadas); 4) Liberação do nucleocápside e de RNA polimerase dependente de RNA celular; 5) Endossoma precoce abrigando a vesícula do vírion; 6) Evolução para endossoma tardio; 7) Fusão e liberação de RNPs (Ribonucleoproteínas virais – RNA genômico maduro e proteína do nucleocápside) e proteínas do envelope viral que são transportadas para o complexo de Golgi para transcrição e tradução; 8) Replicação e amplificação do material genômico; 9) Os vírions nascentes são transportados por vesículas do Complexo de Golgi; 10) Partículas virais em vesículas secretórias são exocitadas da célula. Adaptado de: Vaheri et al., 2013.

1.3 – EPIDEMIOLOGIA E ECOLOGIA

1.3.1 – TRANSMISSÃO

O ciclo de transmissão dos hantavírus ocorre na natureza, principalmente, através da infecção crônica entre roedores silvestres reservatórios que irão hospedar o vírus ao longo da vida. Dessa forma, ao se infectarem, podem eliminar as partículas virais através da saliva, urina e fezes para o ambiente (Lee et al., 1981; Nichol, 1999; Yahnke et al., 2001; Lednicky, 2003; Oliveira et al., 2014).

A infecção em roedores reservatórios ainda é pouco elucidada, porém estudos têm mostrado que ela ocorre de maneira horizontal, através de mordeduras e encontros agonísticos (por território e alimento, por exemplo), bem como a transmissão por aerossóis (Lee et al., 1981; Padula et al., 2004; Mill & Childs, 1998; Mills et al., 2007).

O homem se infecta acidentalmente ao inalar partículas virais aerolizadas de excretas e secreções dos roedores no ambiente (Lee et al., 1981; Lee et al., 1982; Nichol, 1999; Strauss & Strauss, 2002), devido, principalmente, à ocupação humana de áreas de interface entre o ambiente silvestre e peridomiciliar. Outras maneiras de transmissão natural a humanos vêm sendo descritas, porém mais raramente, como ingestão de alimentos contaminados por excretas, contato direto de mucosas com materiais contendo partículas virais e a mordedura de roedores infectados (Peters, 1998b; Wells et al., 1997; Simpson, 1998). A transmissão transplacentária também tem sido relatada (Prebensen, 1997; Hart & Bennett, 1999). Apesar da hantavirose estar relacionada diretamente com a ecologia dos roedores, a transmissão pessoa-pessoa também já foi descrita na Argentina em 1996 e no Chile entre 1997 e 1998, em um surto de SPH, sendo, em ambos os casos, o agente causador o vírus *Andes* (ANDV) (Padula et al., 1998; Toro et al., 1998; Martinez et al., 2005).

1.3.2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS HANTAVÍRUS.

A distribuição dos hantavírus está intimamente relacionada com a distribuição dos seus reservatórios, roedores das famílias *Cricetidae* e *Muridae*. A FHSR está restrita aos continentes europeu, asiático e africano (Figura 1.4), com a circulação do vírus *Hantaan* na China, Coréia, Japão e Rússia, principalmente, do vírus *Dobrava – Belgrade* (DOBV) nos Balcãs, Estônia, Alemanha e Rússia (Plyusnin et al.; 1997; Lundkvist et al.; 1997; Meisel et al., 1998). O vírus *Seoul* tem distribuição mundial em consequência da distribuição do roedor cosmopolita *Rattus norvegicus* enquanto o vírus *Puumala* se encontra restrito ao norte e noroeste da Europa.

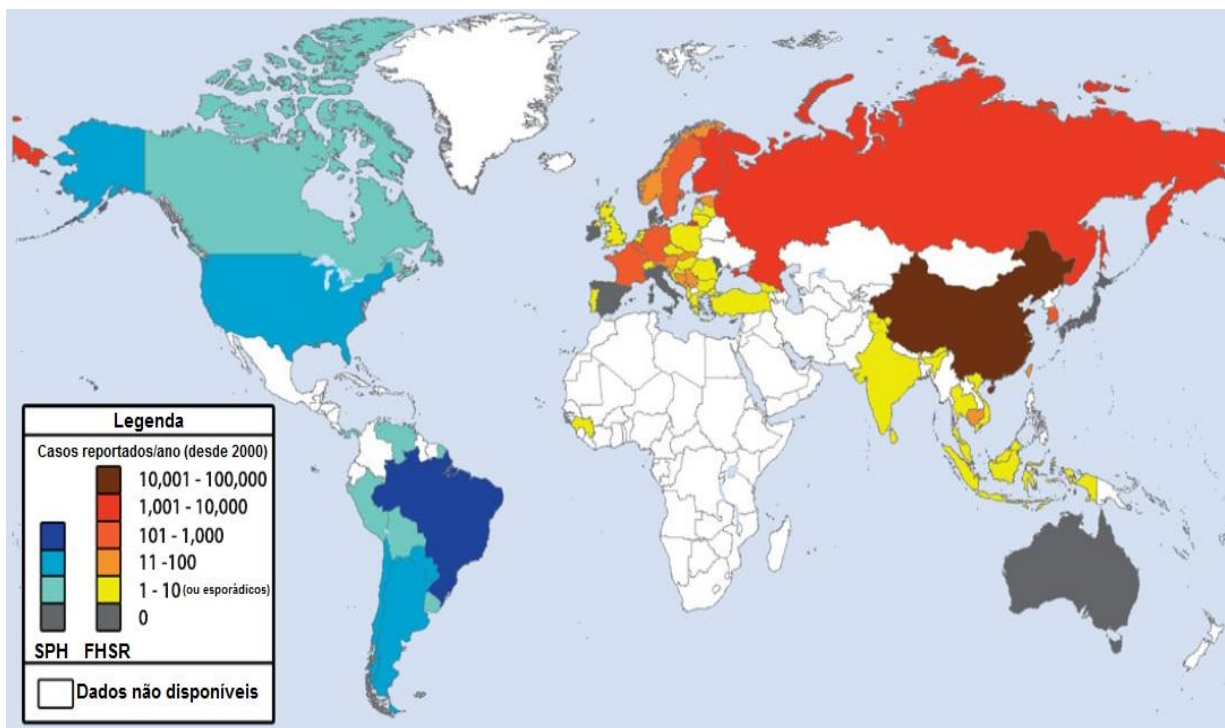


Figura 1.4: Número de casos, do ano de 2000 a 2013, da FHSR e da SPH no mundo e sua distribuição. Adaptado de: Watson et al., 2013.

A SPH tem sido descrita somente nas Américas, com diferentes genótipos virais circulantes nas áreas onde seus reservatórios predominam (Monroe et al., 1999; Hart & Bennett, 1999). O vírus *Sin Nombre*, identificado nos EUA, também tem ocorrência no Canadá. Desde então, mais de 3.000 casos de SPH têm sido relatados com mais de 30 genótipos virais descritos neste continente, com a maioria na América do Sul (Figura 1.5): (i) na Argentina (*Andes* [ANDV], *Bermejo* [BMJV], *Laguna Negra* [LANV], *Lechiguanas* [LECV], *Oran* [ORNV]), (ii) na Bolívia (ANDV, BMJV, LANV, *Tunari* [TUNV]); (iii) no Brasil (*Anajatuba* [ANJV], *Araraquara* [ARQV], *Araucaria* [ARAUV], *Castelo dos Sonhos* [CASV], *Juquitiba* [JUQV], LANV-like); (iv) no Chile (ANDV); (v) no Panamá (*Choclo* [CHOV]); (vi) no Paraguai (LANV); (vii) no Uruguai (*Andes Central Plata* [ACPV]) e (viii) na Guiana Francesa (*Maripa* [MARV]) (Johnson et al., 1997; 1999; Padula et al., 2000; Delfaro et al., 2003; Figueiredo et al., 2003; Levis et al., 2004; Raboni et al., 2009; Jonsson et al., 2010; Matheus S et al., 2010; MacNeil et al., 2011; Cruz et al., 2012; Firth et al., 2012).

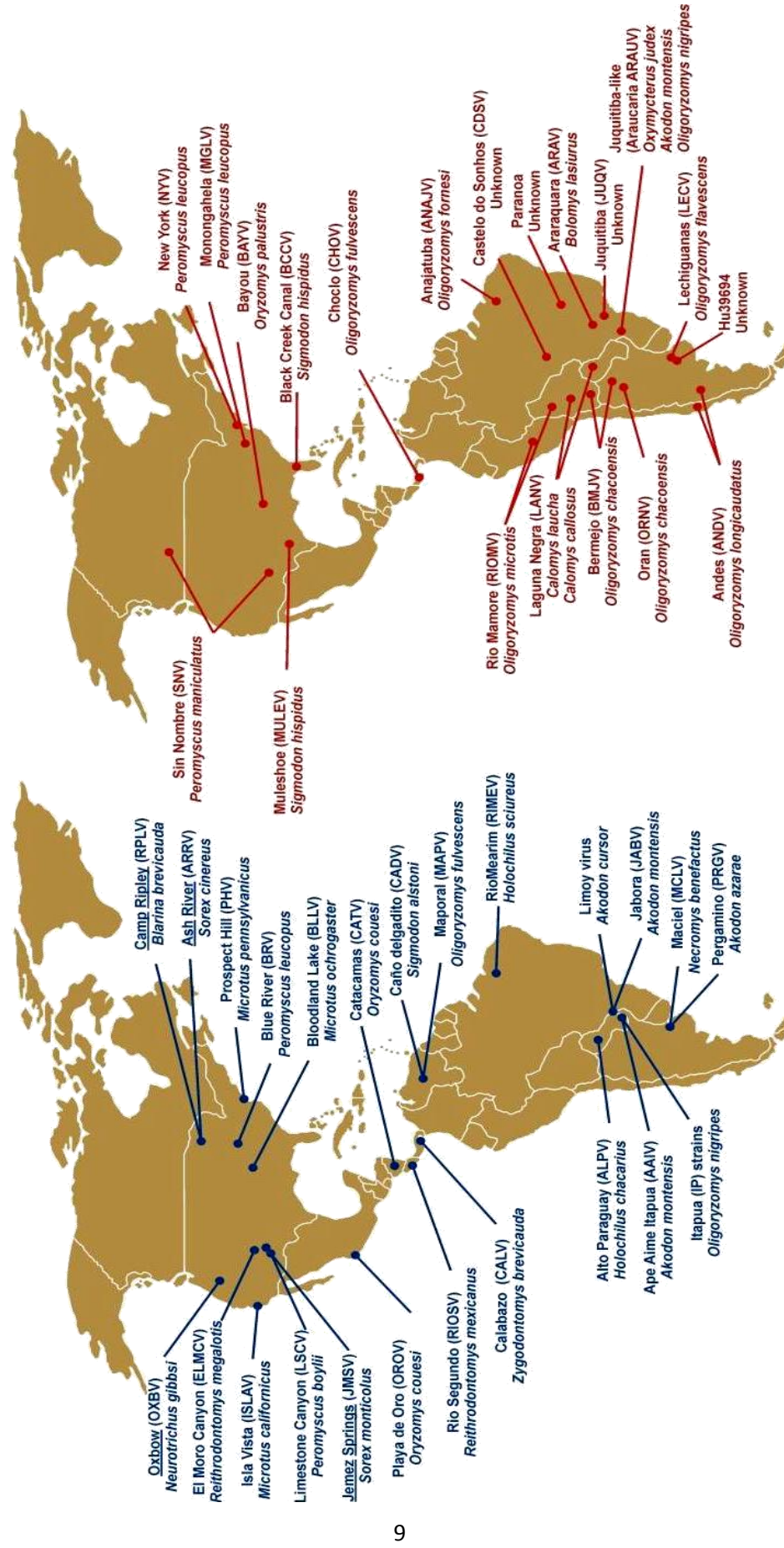


Figura 1.5: Alguns hantavírus não-patogênicos (azul) e patogênicos (vermelho) registrados nas Américas e seus roedores reservatórios até o ano de 2010. Os hantavírus sublinhados representam os relatados em mussaranhos e toupeiras (Soricomorpha). Fonte Hjelte & Torres-Pérez, 2010.

Os hantavírus não-patogênicos até o momento só foram encontrados em roedores silvestres, sem causar doença humana, sem associação, assim, até a presente data, com a SPH (Vicent et al., 2000; Travassos da Rosa et al., 2005; Chu et al., 2006, Oliveira et al., 2011; Oliveira et al., 2014).

1.3.3 – RESERVATÓRIOS

Roedores silvestres da família *Muridae*, mais especificamente da subfamília *Arvicolinae* e *Murinae* no Velho Mundo e da família *Cricetidae*, subfamília *Sigmodontinae* e *Neotominae* no Novo Mundo, são os principais reservatórios de hantavírus.

Os roedores pertencentes à subfamília *Murinae* são endêmicos na Eurásia, com exceção das espécies *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*, que são distribuídas mundialmente, a partir de sua introdução no Novo Mundo por colonizadores europeus. Já os roedores da subfamília *Arvicolinae* apresentam-se distribuídos em todo hemisfério norte, desde a América do Norte até a Ásia, enquanto que roedores sigmodontíneos e neotomíneos ocorrem exclusivamente no continente americano (Nowak, 1991).

Cada hantavírus é específico a uma espécie de roedor reservatório, porém estudos reforçam que, através do fenômeno de *spillover*, infecções por hantavírus em outros hospedeiros não específicos podem ocorrer (Johnson et al., 1999; Hjelle & Torres-Pérez, 2010). Desta forma, a distribuição geográfica do hospedeiro determina a distribuição do vírus e, conseqüentemente, da hantavirose.

Os principais roedores reservatórios na Ásia, norte da Europa e oeste da Europa são, respectivamente, *Apodemus agrarius*, *Clethrionomys glareolus* e *Apodemus flavicollis*. Porém, o papel de outras espécies reservatórias potenciais transmissoras do vírus também é de grande importância, como: *Lemmus sibiricus*, *Microtus arvalis*, *Microtus fortis*, *Bandicota indica* e *Suncus murinus*, reservatórios dos vírus *Topografov* (TOPV), *Tula* (TULV), *Khabarovsk* (KHAV), *Thailand* (THAIV) e *Thottapalayam* (TPMV), respectivamente (Zeier et al., 2005).

Nas Américas, diversos roedores sigmodontíneos têm sido implicados na transmissão da hantavirose no continente. As seguintes espécies são consideradas de grande importância: *Peromyscus maniculatus*, associado ao vírus *Sin Nombre*;

Sigmodon hispidus, ao vírus *Black Creek Canal*; *Oryzomys palustris*, ao vírus *Bayou*; *Peromyscus leucopus*, ao vírus *New York*; *Calomys laucha*, *Calomys callosus* e *Calomys* sp., ao vírus *Laguna Negra* (LANV) ; *Oligoryzomys microtis*, ao vírus *Rio Mamoré* (RIOMV) e *Oligoryzomys longicaudatus*, ao vírus *Andes* (ANDV) (Figuras 1.6 e 1.7) (Nichol et al., 1993; Hjelle et al., 1995; 1996; Johnsson et al., 1997; López et al., 1997; Chu et al., 2003; Ferrer et al., 2003; Schmaljohn & Hjelle, 2004; Zeier et al., 2005).

No Brasil, nove genótipos já foram descritos, com seis deles considerados patogênicos: (i) vírus *Juquitiba* (JUQV) (*Araucária*) associado à espécie *Oligoryzomys nigripes*; (ii) vírus *Araraquara* (ARAV) a *Necomys* (= *Bolomys*) *lasiurus*; (iii) vírus *Castelo dos Sonhos* (CASV) a *Oligoryzomys utiaritensis*; (iv) vírus *Anajatuba* (ANAJV) a *Oligoryzomys fornesi*, (v) vírus *Laguna Negra* a *Calomys callidus* e (vi) vírus *Rio Mamoré* a *Oligoryzomys microtis*; e três não-patogênicos: (i) vírus *Rio Mearin* (RIMEV), associado a *Holochilus sciureus*; (ii) vírus *Jaborá* (JABV), a *Akodon montensis* e (iii) vírus *Seoul*, a *Rattus norvegicus*; (Suzuki et al., 2004; Rosa et al., 2005; Rosa et al., 2011; Rosa et al., 2012; Oliveira et al., 2014).

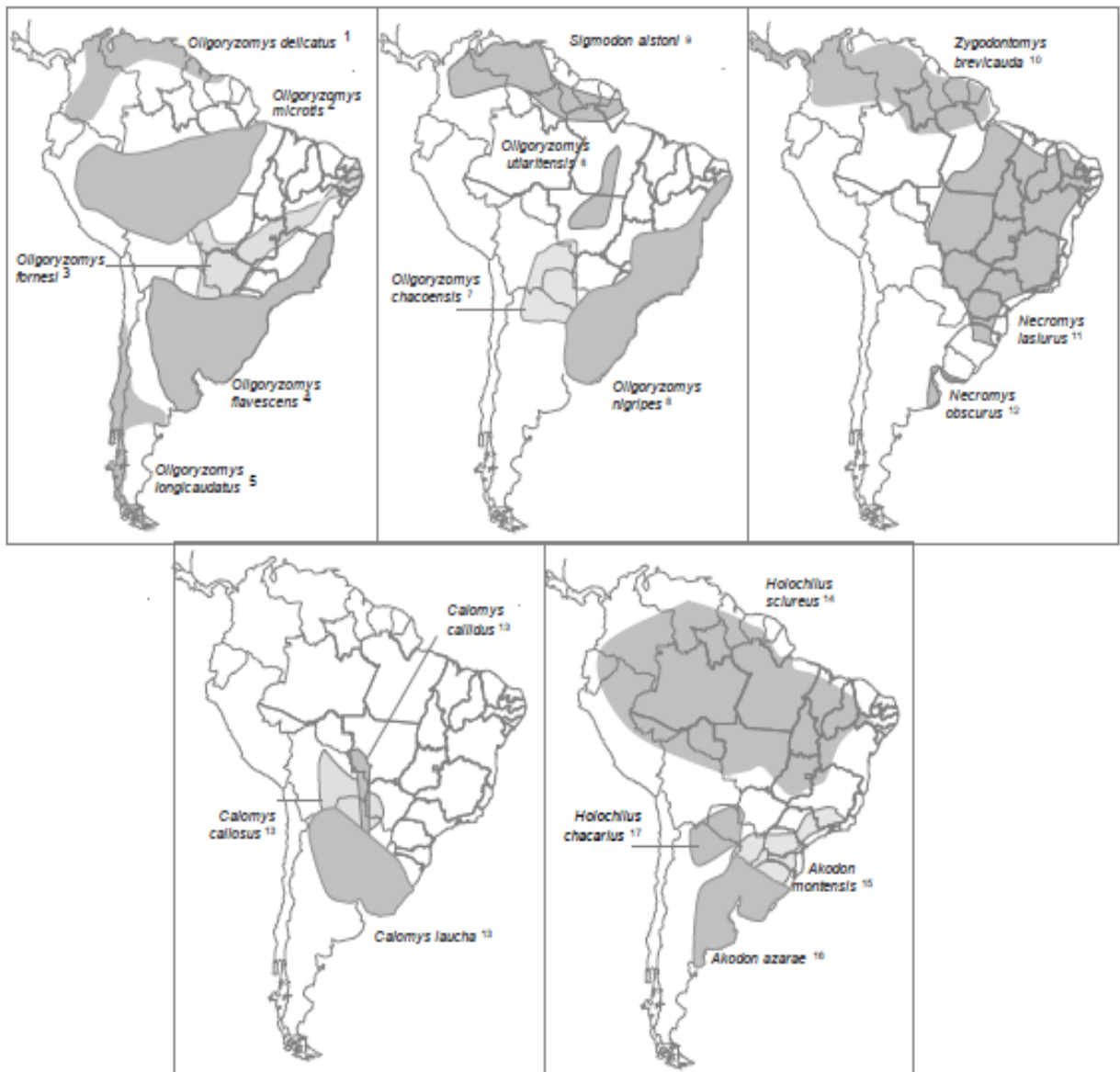


Figura 1.6: Distribuição dos principais reservatórios de hantavírus da América do Sul. O número após os nomes das espécies referem-se ao genótipo hantavírus ou espécie (*) associada: (1) vírus *Maporal*; (2) vírus *Rio Mamoré**; (3) vírus *Anajatuba*; (4) vírus *Lechiguana*s e *Central Plata*; (5) vírus *Andes** e *Oran*; (6) vírus *Castelo dos Sonhos*; (7) vírus *Bermejo*; (8) vírus *Juquitiba* e *Itapuã*; (9) vírus *Caño Delgadito**; (10) vírus *Calabazo*; (11) vírus *Araraquara*; (12) vírus *Maciel*; (13) vírus *Laguna Negra**; (14) vírus *Rio Mearin*; (15) vírus *Ape Aime-Itapua* e *Jabora*; (16) vírus *Pergamino*; (17) vírus *Alto Paraguay*. Adaptado de: Oliveira et al., 2014.

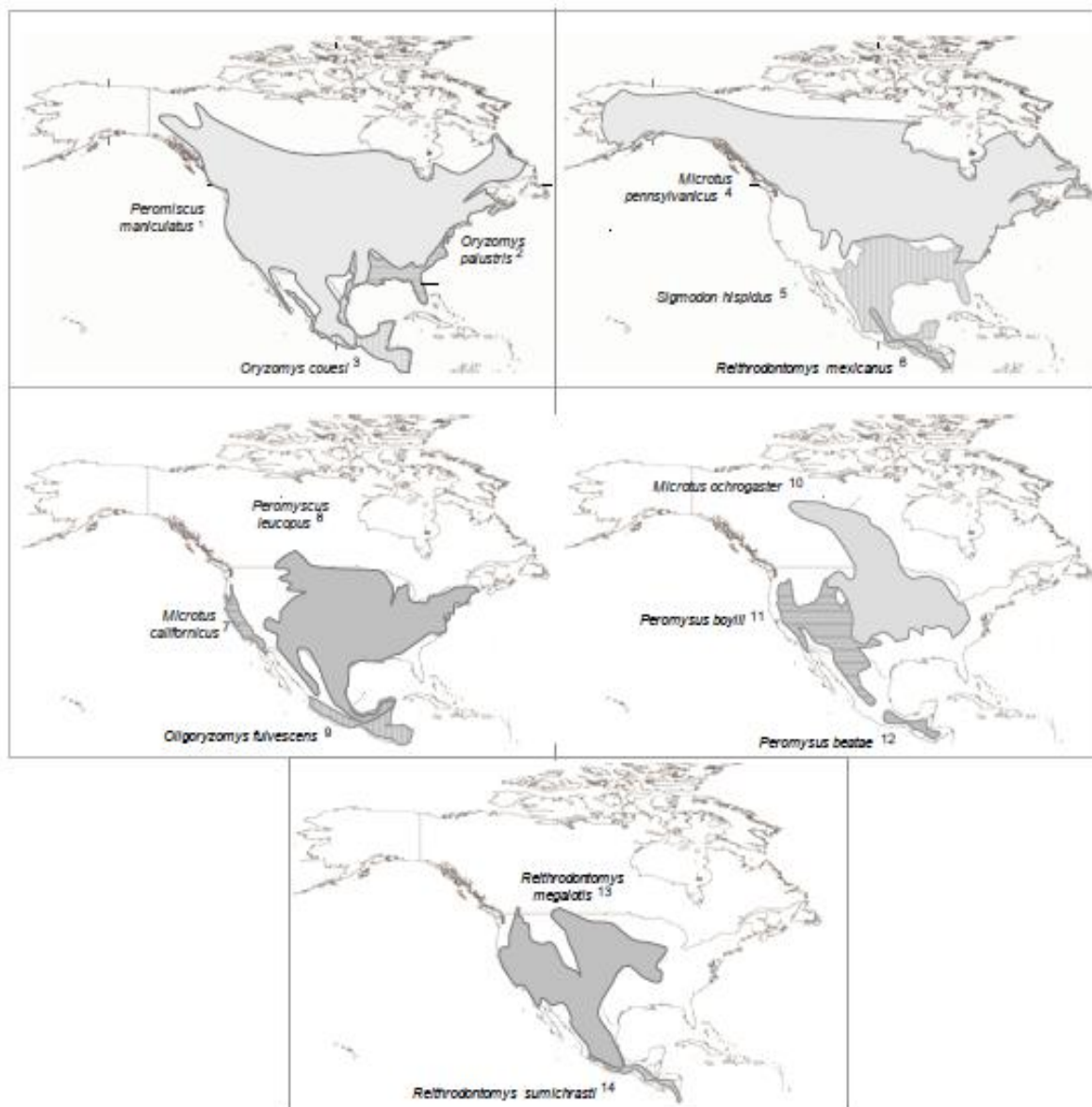


Figura 1.7: Distribuição dos reservatórios principais de hantavírus na América do Norte: (1) vírus Sin Nombre* e Monongahela; (2) vírus Bayou*; (3) vírus Catacamas e Playa de Oro; (4) vírus Prospect Hill; (5) vírus Black Creek* e Muleshoe*; (6) vírus Rio Segundo*; (7) vírus Isla Vista; (8) vírus Blue River e New York*; (9) vírus Choclo; (10) vírus Bloodland Lake; (11) vírus Limestone Canyon; (12) vírus Montano; (13) vírus El Moro Canyon* e Huitzilac; (14) vírus Carrizal. Adaptado de: Oliveira et al., 2014.

No reservatório, a infecção é assintomática ou pouco deletéria, como demonstrado em estudos de infecção experimental em ratas com vírus *Puumala* e em *Apodemus agrarius* ou em camundongos lactantes com o vírus *Hantaan*. Nestes casos, a doença não foi detectável, porém o vírus foi detectado em diversos tecidos

como pulmões, baço, fígado, pâncreas, glândulas salivares, rim, bexiga, cérebro e tecido adiposo. Na urina, o vírus foi excretado até o fim do experimento (270 dias), apesar dos níveis de anticorpos, das classes IgM e IgG, específicos permanecerem altos (Yanigahara et al., 1985; Hart & Bennett, 1994; 1999). Contudo, há um período de maior eliminação das partículas virais, que é de três a oito semanas pós-infecção (Engelthaler et al., 1999).

Casos humanos de hantavirose têm sido associados às características populacionais dos roedores, como tamanho populacional, competição intraespecífica e interespecífica, atividade reprodutiva, maturação sexual entre outros, bem como características climáticas, como precipitação e temperatura, possibilitando a ocorrência de surtos da doença (Engelthaler et al., 1999; Gubler et al., 2001; Yates et al., 2002; Jonsson et al., 2010).

Características comportamentais dos roedores também garantem a manutenção do vírus no ambiente. Estudos mostram que encontros agonísticos por disputa de território e alimento, por exemplo, podem ser importante via de transmissão, considerando a presença de mordidas e arranhões principalmente em machos, gênero que apresenta maior prevalência de infecção viral (Mills & Childs, 1998; Mills et al., 2007).

Em áreas periurbanas, onde há presença de habitações humanas próximas às áreas rurais, há uma facilidade de se encontrar roedores, pois os mesmos invadem estes locais em busca de alimento ou mesmo fugindo de queimadas nas plantações de cana-de-açúcar, por exemplo. Da mesma forma, áreas consideradas outrora rurais, devido à expansão das áreas urbanas, também possibilitam o encontro dos roedores com humanos, favorecendo, conseqüentemente, a transmissão da hantavirose (Ferreira, 2003).

1.3.4 – DISTRIBUIÇÃO DE CASOS HUMANOS NO BRASIL E SINDROME PULMONAR POR HANTAVIRUS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

Os primeiros relatos da SPH no Brasil datam de novembro de 1993, ocorridos no município de Jujutiba, no estado de São Paulo, culminando com mais de 1.600 casos notificados até maio de 2013. Segundo dados do Ministério da Saúde, as regiões sul (n=583) e sudeste (n= 468) são as que apresentam o maior número de casos, seguidas

pelas regiões centro-oeste (n=164), norte (n=101) e nordeste (n=14). Com casos notificados em 15 unidades federadas, Minas Gerais (n=278), Santa Catarina (n=264) e Mato Grosso (n=248) são os estados que apresentam maior número de casos (Figura 1.8).

A região sudeste lidera a estatística em número de óbitos (n=272), seguida da região sul (n=190) e centro-oeste (n=171), com uma taxa de mortalidade em torno de 39,8% em todo o território nacional.

Considerada uma doença de notificação compulsória e de investigação obrigatória, a hantavirose tem apresentado um aumento significativo do número de casos notificados em decorrência, entre outros fatores, da sensibilização dos profissionais da saúde no seu diagnóstico, além do treinamento especializado para a investigação pela vigilância epidemiológica.

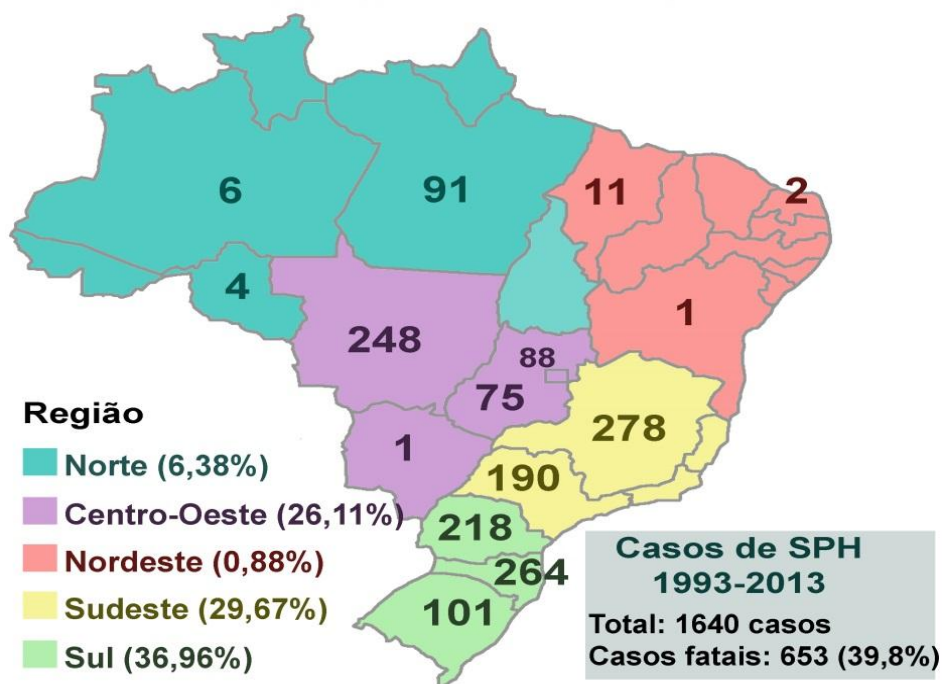


Figura 1.8: Número de casos de Hantavirose no Brasil por unidade federada, 1993 a 2013. Adaptado de: SVS/ Ministério da Saúde (www.portalsaude.saude.gov.br).

Segundo dados de 2009 da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, metade dos indivíduos acometidos pela doença, de 1993 até 2009, residiam em área rural (50%); cerca de 65,0% exerciam ocupação relacionada com atividades agrícolas e/ou de pecuária e 77,6% eram do sexo masculino. A faixa etária mais atingida

foi a de 20 a 39 anos (com amplitude de 8 meses a 66 anos), com 58,2% das ocorrências. Em 758 casos (67,7%), a infecção ocorreu em ambiente de trabalho. A necessidade de assistência hospitalar foi observada em 88,6% dos pacientes e a taxa de letalidade média foi de 46,5%.

De 1º de janeiro de 2013 até sete de maio de 2013, somente cinco casos da doença foram notificados no Brasil; um único caso nos estados de Rondônia, Pará, Paraná, Santa Catarina e um de ocorrência indeterminada, com quatro óbitos (MS, 2013).

Embora os hantavírus sejam reconhecidos como importantes agentes da doença no Novo Mundo, a incidência de infecção por hantavírus provavelmente tem sido subestimada, devido em parte às características clínicas compartilhadas com uma variedade de outras síndromes e a possibilidade de manifestações clínicas mais brandas ou mesmo de quadros assintomáticos.

Diversos inquéritos sorológicos têm sido realizados por todo o território nacional a fim de esclarecer um pouco mais sobre a doença e sua circulação (Tabela 1).

É importante ressaltar que, apesar dos 12 estados - Acre, Roraima, Amapá, Tocantins, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Espírito Santo e Rio de Janeiro - não apresentarem casos confirmados de hantavirose, a possibilidade da circulação viral não pode ser descartada, tendo em vista o pouco conhecimento da hantavirose em relação a outras enfermidades, especialmente em regiões com grandes epidemias, cuja manifestação clínica se assemelha à SPH. Corroborando com este fato, durante a epidemia de dengue de 2008, um estudo sorológico realizado no estado do Ceará, em 72 pacientes com história clínica de febre aguda consistente com dengue, foi possível identificar, pelo teste sorológico ELISA, duas amostras IgG e uma amostra IgM reativas para hantavírus constituindo, assim, a primeira evidência da infecção por hantavírus no estado do Ceará (Lima et al., 2011).

Tabela 1.1: Inquéritos sorológicos para investigação de hantavírus em amostras humanas realizados em diversos estados brasileiros.

Município /Estado	Ano	Nº de amostras	Amostras reativas		Autores
			IgM	IgG	
Recife/PE	1990	156	2 (1,3%)	8 (5,1%)	Hindrichsen, 1993
Salvador/BA	1998	379		50 (13,2%)	Mascarenhas-Batista et al., 1998
Jardinópolis/SP	2001	818	117 (14,3%)		Campos et al., 2003
Ribeirão Preto/SP	2005 a 2008	52	11 (21,2%)	1 (0,52%)	Figueiredo et al., 2010
Maranhão	2004 a 2006	1386		65 (4,7%)	Mendes et al., 2010
Cássia dos Coqueiros /SP	1987 a 1990	1876		89 (4,7%)	Badra et al., 2012
Santa Catarina	2011	450		8 (1,97%)	Souza et al., 2012
Turvo/SC	2012	257		6 (2,3%)	Pereira et al., 2012
Amazonas	2007 a 2009	1731	0 (0%)	10 (0,6%)	Gimaque et al., 2012
Marcelândia/MT	2013	54		7 (13%)	Santos et al., 2013
Sobradinho/MT	2009 a 2010	33	9 (52,9%)	17 (51,1%)	Terças et al., 2013

Considerando a ocorrência da SPH em Minas Gerais e de São Paulo, estados que fazem divisa com o estado do Rio de Janeiro, e a possibilidade de confusão diagnóstica da SPH com dengue, em especial durante o período de epidemias desta arbovirose, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos, na última década, com o objetivo de se compreender a real situação da doença no estado. Assim, estudos com roedores silvestres têm demonstrado a circulação de hantavírus patogênico no Rio de Janeiro. Um destes estudos foi realizado por Sobreira e colaboradores que demonstraram evidência sorológica de roedores silvestres infectados em uma área de peste bubônica na região serrana fluminense em 2008. Em 2009, Oliveira e colaboradores identificaram o hantavírus *Juquitiba* na espécie de roedor silvestre *Oligoryzomys nigripes*, configurando a primeira identificação e caracterização molecular de hantavírus no território fluminense. Quanto à população humana, embora não exista caso notificado da SPH, em 2003, 9,3% das amostras de casos suspeitos de leptospirose procedentes da região metropolitana do Rio de Janeiro apresentaram reatividade sorológica para hantavírus

(Lemos et al., 2003). Mais recentemente, em 2006, no município do Rio de Janeiro, foram encontrados anticorpos anti-hantavírus em pacientes HIV reativos em pacientes residentes da região de Jacarepaguá (Lamas et al., 2013).

1.4 – ASPECTOS CLÍNICOS DA SÍNDROME PULMONAR POR HANTAVÍRUS.

1.4.1 – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.

A SPH apresenta-se como doença febril aguda caracterizada pelo grave comprometimento cardiovascular e respiratório que, clinicamente, assemelha-se a síndrome respiratória aguda grave (Jenison et al., 1995; Hallin et al., 1996).

A doença pode apresentar desde formas assintomáticas a quadros graves clássicos de alta letalidade. O período de incubação estimado é de 5 a 60 dias, com média de 15 dias, o qual o paciente pode desenvolver um quadro semelhante a diversas doenças respiratórias agudas, como influenza, podendo evoluir para uma forma respiratória grave (Lemos & Silva, 2005; De Borba et al., 2013).

A doença pode progredir muito rapidamente e pacientes que se apresentam com dispnéia normalmente requerem intubação e ventilação mecânica dentro de 1 a 6 horas (Hallin et al., 1996; Simpson, 1998).

A SPH tem sido associada com uma alta taxa de letalidade e é caracterizada por febre e extravasamento vascular resultando em edema pulmonar não-cardiogênico seguido em diversos casos por choque com acidose láctica, um baixo índice cardíaco e elevada resistência do sistema vascular (Enria et al., 2001; Jonsson et al., 2008).

Geralmente a SPH apresenta três fases clínicas, com algumas variações em incidência e gravidade dos sintomas entre os pacientes: a fase prodrômica ou inespecífica, a fase cardiopulmonar e a fase convalescente. Na fase prodrômica, com duração de um a seis dias, observa-se manifestações inespecíficas caracterizadas por febre, mialgia, dor dorso-lombar, dor abdominal, cefaleia intensa e sintomas gastrointestinais como náuseas, vômito e diarreia. Sintomas respiratórios são menos frequentes nesta fase. Anticorpos das classes IgM e IgG podem ser tipicamente detectados nesta fase ou logo após o início do pródrômo (Figura 1.9) (Jonsson et al., 2008).

A fase cardiopulmonar é caracterizada pelo início da tosse seca, com progressiva infiltração de líquido e proteínas no interstício e alvéolos pulmonares, levando à taquicardia, taquidispnéia e hipoxemia, podendo evoluir rapidamente para uma forma grave com insuficiência respiratória aguda com edema pulmonar não cardiogênico, hipotensão arterial e colapso circulatório. O óbito pode ocorrer poucas horas após o início da falência respiratória, mesmo em indivíduos ventilados precocemente; alguns pacientes, entretanto, passam dias ou mesmo semanas, sob ventilação mecânica, e muitos destes se recuperam, sem qualquer seqüela. Os pacientes que sobrevivem evoluem para uma fase diurética em que há absorção de líquido retido no interstício, seguida da fase de convalescença (Figueiredo et al., 2001; Ferreira, 2003; Lemos & Silva, 2005).

Como as manifestações clínicas iniciais são muito semelhantes às de diversas enfermidades, o diagnóstico da SPH pode ser confundido com uma série de outras doenças fazendo-se necessário o diagnóstico diferencial (Ferreira, 2003).

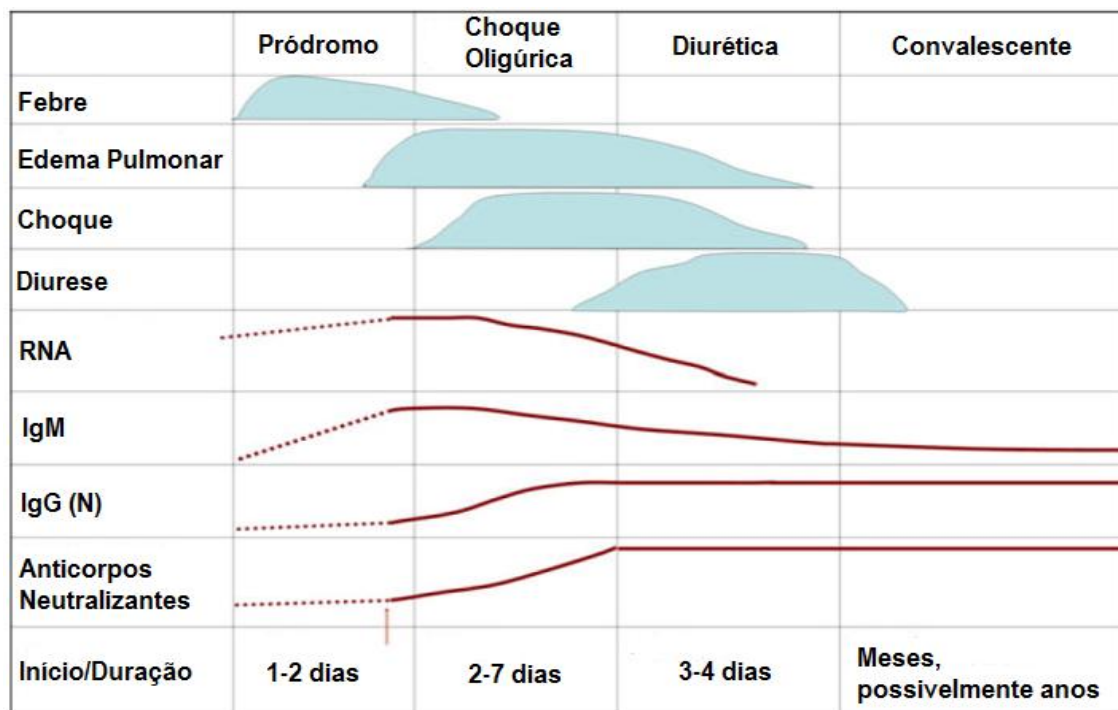


Figura 1.9: Curso clínico da síndrome pulmonar por hantavírus. Adaptado de: Jonsson et al., 2008.

1.4.2 – TRATAMENTO.

Não há terapia antiviral específica e eficaz para o tratamento da SPH. O tratamento das formas leves é sintomático. Porém, por se tratar de uma doença com progressão rápida e de alta gravidade, é recomendado que os pacientes suspeitos sejam removidos imediatamente para unidade de terapia intensiva (Peters, 1998; Simpson, 1998).

A administração de fluidos deve ser cuidadosa para evitar sobrecarga de volume, pois pode precipitar o edema pulmonar, reforçando que o manejo adequado do aporte líquido é o principal elemento terapêutico (Iversson, 1996; Figueiredo et al., 2001; Lemos & Silva, 2005).

Estudos realizados com o uso de ribavirina, em pacientes com FHSR, apontam resultados com certa eficiência no tratamento, se esta é administrada precocemente (Huggins et al., 1991). Estudos não controlados sobre a utilização deste antiviral nos EUA estão em desenvolvimento, porém ainda não comprovaram a sua eficácia na SPH (Peters et al., 1998; Ferreira et al., 2000).

A administração de anticorpos neutralizantes humanos durante a fase aguda do HPS pode revelar-se eficaz para o tratamento e/ou profilaxia de infecções por hantavirus. Bharadwaj e colaboradores (2000) descobriram que os pacientes com títulos mais baixos de anticorpos neutralizantes, muitas vezes apresentam doença grave, enquanto que aqueles com títulos mais altos manifestam com doença leve.

1.5 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.

O diagnóstico laboratorial é realizado a partir de achados tanto inespecíficos quanto específicos. No hemograma tem-se como achados laboratoriais mais comuns, linfócitos atípicos (>10%), plaquetopenia (<20.000 até 150.000), leucócitos normais ou com desvio à esquerda, hemoconcentração (hematócrito >45%), radiografia simples de tórax normal ou com infiltrados difusos, uni ou bilaterais (GVE/Ministério da Saúde, 2009). Cerca de 75 a 100% dos pacientes com SPH demonstram alterações das provas funcionais hepáticas. Os níveis séricos de lactato encontram-se elevados nos casos graves e esse parâmetro laboratorial pode indicar mau prognóstico. Em relação aos achados da radiografia de tórax, embora na fase prodrômica o resultado seja normal, em

poucas horas de evolução, em decorrência do aumento de permeabilidade capilar, surge um infiltrado intersticial, com o padrão de pneumonia atípica, com edema pulmonar e derrame pleural, caracterizando, assim, a fase cardiorrespiratória (Figura 1.10) (Ketai et al., 1994; Jenisson et al., 1995; Ferreira, 2003).

O diagnóstico laboratorial específico baseia-se na detecção de anticorpos das classes IgM e IgG, a partir de testes sorológicos, contra a nucleoproteína viral. O teste mais utilizado é o ensaio imunoenzimático (ELISA), um teste que utiliza proteínas recombinantes de hantavírus como antígeno, por apresentar maior sensibilidade e especificidade, 97,2% e 100% respectivamente. Além do ELISA, técnicas de imunofluorescência indireta em células de rim de macaco verde africano (VERO E-6) infectadas, a neutralização por redução de placa, hemaglutinação passiva e Westernblot também podem ser utilizadas como ferramenta diagnóstica (Enria et al., 1998; Hart & Bennett, 1999; Padula et al., 2000; Figueiredo et al., 2009).

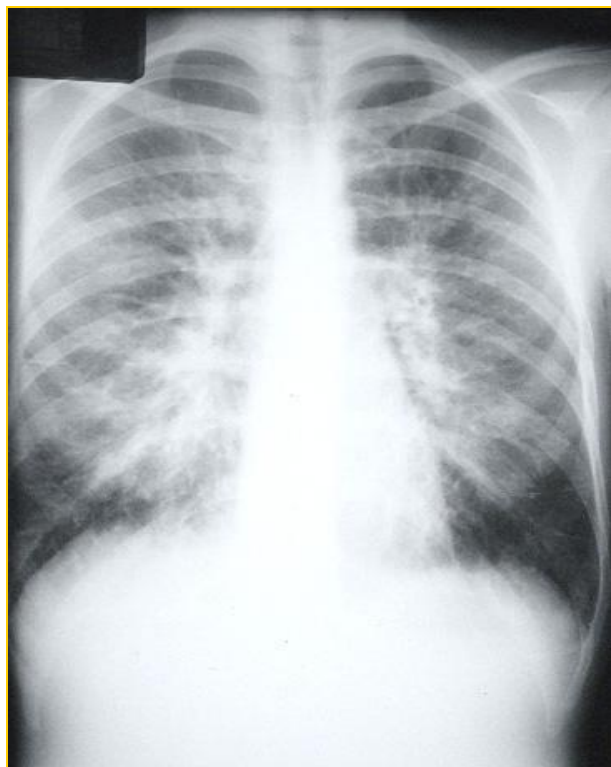


Figura 1.10: Radiografia de tórax do primeiro caso confirmado da síndrome pulmonar por hantavírus no Brasil, mostrando o infiltrado bilateral. Fonte: Lemos & Silva, 2004.

O ELISA-IgM é realizado no formato de captura “in house”, com adição de antígeno controle inespecífico, com o objetivo de evitar reações cruzadas e resultados falso-positivos (Ksiazek et al., 1995; Figueiredo et al., 2009).

A presença dos anticorpos da classe IgM que surgem precocemente, concomitantemente ao início dos sintomas, e que permanecem na circulação até cerca de 60 dias ou a quadruplicação dos títulos de IgG em amostras de soro pareadas confirmam a suspeita clínica. O método diagnóstico ELISA-IgM é utilizado em ambas formas da doença (FHSR ou SPH) e também pode ser bem eficiente em época de surtos, já que cerca de 95% dos pacientes com SPH têm IgM detectável no início dos sintomas. Os anticorpos da classe IgG persistem por toda a vida do indivíduo e podem ser utilizados em investigações sorológicas, visando diagnosticar infecções passadas sintomáticas ou assintomáticas, e têm sido utilizados mais frequentemente em estudos epidemiológicos (Ferreira, 2003; GVE/Ministério da Saúde, 2009).

Para confirmação diagnóstica, as técnicas de imunohistoquímica, a partir de biópsia e/ou necropsia de órgãos, e de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), a partir de amostras de soro e sangue, além de tecido, mostram-se eficientes para detecção do RNA viral (Figueiredo et al., 2014). A primeira é utilizada para detectar antígenos virais em fragmentos de tecidos exclusivamente em casos fatais, já a segunda, geralmente identifica o RNA viral entre 7 a 10 dias de doença. Embora “primers” específicos para amplificação, provenientes de sequências genéticas obtidas de tecidos humanos ou de roedores, venham sendo utilizadas na RT-PCR, diferenças significativas entre os vírus isolados de cada região ou país, eventualmente podem complicar o uso e a sensibilidade da técnica para uso rotineiro no diagnóstico das hantavirose (Jenison et al., 1995; Peters, 1998; Terajima et al., 1999; Ferreira, 2003).

Para diagnóstico laboratorial de hantavírus em espécies de roedores hospedeiras em estudos epidemiológicos é realizada a técnica de ELISA, para detecção de anticorpos da classe IgG anti-hantavirus, além da análise molecular semelhante à descrita para amostras humanas (Lee, 1988; Padula et al., 2000a).

1.6 - DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL E A DENGUE

O diagnóstico diferencial deve ser realizado com inúmeras outras doenças, tanto de origem infecciosa quanto não infecciosa. Entre as doenças infecciosas, a SPH pode se confundir com leptospirose, influenza, parainfluenza, dengue, febre amarela e febre do Vale Rift, viroses causadas por coxsackievirus, adenovírus e arnavírus, triquinelose, malária, pneumonias (virais, bacterianas, fúngicas e atípicas), septicemias, rickettsioses, histoplasmose, legionelose, peste pulmonar, antraz respiratório e pneumocistose.

Quanto às doenças não infecciosas, a síndrome da angústia respiratória (SARA), o edema agudo de pulmão (cardiogênico), pneumonia intersticial por colagenopatias (lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide), abdômen agudo de etiologia variada, estenose mitral e doença pulmonar obstrutiva crônica, entre outras, cujo curso clínico pode ser semelhante à SPH, precisam também ser incluídas no diagnóstico diferencial (GVE/Ministério da Saúde, 2009).

Em relação à dengue, considerando a sua importância na saúde pública, por estar associada com explosivas epidemias urbanas desde a década de 1980 (5.423.999 casos notificados de 1981 a 2009), e por sua similaridade clínica com a hantavirose, o diagnóstico diferencial passa a ser um grande desafio para o clínico, especialmente nos períodos de epidemia, quando, em decorrência do elevado número de casos, não raramente, o diagnóstico de dengue pode ser realizado sem confirmação laboratorial (GVE/Ministério da Saúde, 2009). É pertinente reforçar que a reposição e manutenção do volume de líquido perdido pelo paciente é a medida mais importante no tratamento nos casos de dengue, procedimento que, no caso da SPH, aumenta o extravasamento de líquido para o pulmão, com conseqüente piora da insuficiência respiratória. Assim, o diagnóstico diferencial entre estas duas doenças passa ser imprescindível, pois a conduta terapêutica preconizada para dengue é inadequada e prejudicial para a SPH, para qual está indicado o uso de inotrópicos (Lemos & Silva, 2013).

Causada por quatro sorotipos - DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 -, a dengue é uma doença febril aguda que pode causar manifestações clínicas de amplo espectro clínico, de acordo com as características do hospedeiro e do vírus, para qual o diagnóstico etiológico definitivo deve ser com base nos dados clínico-laboratoriais (Gubler, 2002).

Com a circulação dos quatro sorotipos no Brasil, antes da introdução mais recente do DENV4 em 2010 no Brasil e em 2011 no estado do Rio de Janeiro (Nogueira & Eppinghaus, 2011; SVS, 2011), o diagnóstico laboratorial vinha sendo realizado,

mais frequentemente, a partir de testes sorológicos ELISA que detectam anticorpos das classes IgM e IgG. De uma forma geral, apesar da diferença de perfil na produção de anticorpos nas infecções primárias e secundárias, os anticorpos da classe IgM geralmente são detectados entre o 3^o/ 5^o dia e os da classe IgG, entre o 10^o /14^o (Figura 1.11).

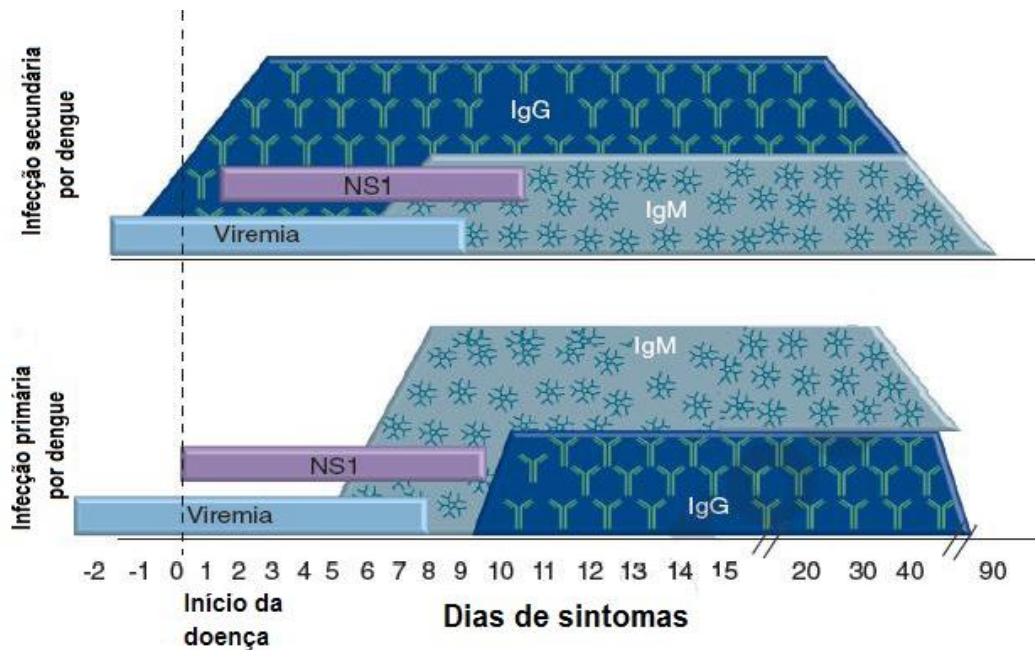


Figura 1.11: Cinética de antígeno e de anticorpo nas infecções por dengue. Adaptado de: Lima et al., 2014.

Embora a presença de anticorpos da classe IgM em única amostra de soro confirme infecção ativa ou recente, os testes sorológicos apresentam limitações devido à variação dos níveis dos anticorpos anti-DENV específicos na fase aguda da doença e, assim, mais recentemente o diagnóstico na rotina passou a ser realizado também a partir da pesquisa de antígeno NS1 (proteína não estrutural 1) (OPAS, 1997; Schilling et al., 2004; Guzman et al., 2010).

Neste contexto, considerando a circulação dos quatro sorotipos e a dificuldade na interpretação dos testes sorológicos, já que em caso de infecção secundária pode ser observada uma elevação precoce dos títulos de anticorpos da classe IgG, tem se preconizado, a utilização de outros testes laboratoriais como o isolamento viral, a detecção do genoma e do antígeno que, embora mais específicos, não estão disponíveis para a rotina da maioria dos laboratórios nacionais.

1.7 – CONTROLE E PREVENÇÃO

As principais estratégias de controle e prevenção são aquelas relacionadas com a redução do contato com os reservatórios e seus excretas, evitando estes ambientes (Lemos e Silva, 2005). Esta deve ser definida de acordo com o conhecimento prévio da biologia dos roedores envolvidos e seus habitats em cada área (domiciliar, peridomiciliar e silvestre).

O controle desses reservatórios naturais do vírus no ambiente silvestre não é prático e pode levar a desequilíbrio ecológico. Entretanto, a eliminação dos animais no peridomicílio e no domicílio mostra-se factível e deve ser realizada de forma estratégica e contínua (Ferreira, 2003). Podemos citar como forma de controle de roedores: armazenamento de produtos agrícolas e seus insumos em locais apropriados e suspensos, distantes do domicílio; eliminação de resíduos, entulhos e objetos desnecessários, a fim de diminuir a possibilidade de abrigos; alimentos devem ser estocados e armazenados de maneira apropriada em recipientes fechados; vedação de portas e janelas das residências para evitar a entrada de roedores; remoção de alimentos de animais domésticos em horários nas quais os mesmos sejam desnecessários; coletas regulares de lixo e armazenagem a uma altura adequada a pelo menos 1,5 metros do chão. Caso não exista coleta de lixo, este deve ser enterrado a uma distância mínima de 30 metros do domicílio e de fontes de água. O controle de roedores geralmente só se realiza diante de alta infestação e esta prática geralmente é feita entre os limites de domicílio e peridomicílio. Práticas de higiene e medidas corretivas como saneamento e melhorias nas condições de moradia são importantes para reduzir o contato com estes roedores e ambientes contaminados (GVE/Ministério da Saúde, 2009).

Em relação à população em geral, é importante a realização de medidas educativas para prevenir e controlar o acesso de roedores nas residências e também esclarecer sobre os roedores envolvidos, suas vias de transmissão e a gravidade da doença.

Segundo recomendações do Ministério da Saúde, em ambientes que possam ser locais prováveis de infecção e que possam estar potencialmente contaminados, os cuidados devem ser rigorosos. A ventilação de ambientes fechados deve ser realizada pelo menos 30 minutos antes da limpeza do local. Não se deve varrer o chão seco, pois o mesmo pode levantar partículas de poeira contendo o vírus. A maneira mais adequada,

nesta situação, é umedecer pisos, paredes e utensílios, com solução de água sanitária a 10% ou de lisoforme e aguardar 30 minutos antes de proceder à limpeza com máscaras com filtro tipo P3 e luvas de borracha.

A vigilância epidemiológica e os trabalhos eco-epidemiológicos são importantes para elucidar e contribuir para o conhecimento sobre a dinâmica dos reservatórios e da hantavirose em áreas endêmicas e não endêmicas, constituindo, assim, ferramentas importantes para controle e a prevenção da SPH (Mills & Childs, 1998; Vicent et al., 2000).

Estudos para encontrar uma vacina eficaz contra a hantavirose têm sido realizados. Na Ásia, vacinas com os vírus *Hantaan*, *Seoul* e *Puumala* inativados têm eficácia comprovada, porém não garantem proteção contra outros vírus causadores da SPH (Schmaljohn & Hjelle, 1997; Peters, 1998; Park et al., 2004). Desta forma, as melhores medidas profiláticas a serem tomadas pela população são as que concernem diminuir o contato com roedores e seus excretas até que uma vacina eficaz contra a SPH seja produzida.

2 – JUSTIFICATIVA

A hantavirose, uma zoonose emergente descrita no Brasil desde 1993, apresenta espectro clínico semelhante a diversas doenças infecciosas como a dengue e a leptospirose, o que dificulta o diagnóstico diferencial, em especial, nas áreas, nas quais as epidemias têm sido identificadas, como é o caso do estado do Rio de Janeiro, onde, somente no primeiro bimestre de 2013, 91,4 pessoas se infectaram para cada 100 mil habitantes (OPAS, 2013).

Embora até a presente data não existam casos notificados da SPH no estado do Rio de Janeiro, a realização do presente estudo se justifica considerando que: (i) foram encontradas evidências sorológicas de infecção por hantavírus em humanos e roedores (Lemos et al., 2003; Silva et. al, 2005; Lamas et al., 2013); (ii) foi identificada a presença do hantavírus patogênico *Juquitiba* entre roedores silvestres no Parque Nacional da Serra dos Órgãos em Teresópolis (Oliveira et al., 2009) relacionado ao roedor *Oligoryzomys nigripes*, e (iii) existem centenas de amostras de casos suspeitos, mas descartados laboratorialmente, de dengue que se encontram acondicionadas no Laboratório de Saúde Pública Noel Nutels e que, até a presente data, não tem etiologia definida.

A avaliação destas centenas de amostras de casos suspeitos de dengue no estado do Rio de Janeiro, que foram negativas no teste sorológico, assim como a pesquisa em roedores para a presença de infecção por hantavírus, contribuirão para aumentar o nosso conhecimento sobre a presença de hantavírus no território fluminense e auxiliar no diagnóstico diferencial no contexto do sistema de vigilância epidemiológica em nosso estado e no Brasil.

3 – OBJETIVOS.

3.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de infecção por hantavírus em humanos e em roedores silvestres e sinantrópicos no estado do Rio de Janeiro, contribuindo para a vigilância epidemiológica desta zoonose.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I) Detectar a presença de anticorpos anti-hantavírus da classe IgM, utilizando imunoensaio enzimático (antígeno Araraquara), nas amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de dengue sem confirmação sorológica, nos municípios do estado do Rio de Janeiro.
- II) Determinar o genótipo viral das amostras humanas sororreativas através de diagnóstico molecular.
- III) Avaliar a presença de anticorpos anti-hantavírus em roedores silvestres e sinantrópicos capturados em municípios do estado do Rio de Janeiro utilizando o imunoensaio enzimático com o antígeno Araraquara.
- IV) Caracterizar os hantavírus identificados em amostras de roedores sororreativos por diagnóstico molecular.

4 – METODOLOGIA.

4.1 – ÁREAS DE ESTUDO.

Considerando que o estudo foi constituído por dois subprojetos, desenvolvidos subsequentemente - um estudo em roedores silvestres capturados em diferentes regiões do estado e, um segundo estudo, em amostras de pacientes de diversos municípios fluminenses procedentes do LACEN- Noel Nutels, Rio de Janeiro. As áreas de estudo serão detalhadamente descritas nos tópicos seguintes, de acordo com a divisão do território do estado do Rio de Janeiro com base no Plano de Desenvolvimento Econômico e Social, no qual o território fluminense passou a ser dividido em oito Regiões de Governo: Metropolitana (17 municípios), Noroeste Fluminense (13), Norte Fluminense (9), Baixadas Litorâneas (13), Serrana (14), Centro-Sul Fluminense (10), Médio Paraíba (12) e Costa Verde (4) (Figura 4.1.).



Figura 4.1: Mapa do Estado do Rio de Janeiro, Regiões de Governo, segundo Divisão Político-Administrativa. Fonte: CIDE, 2004.

4.2 – ESTUDO COM POPULAÇÃO DE ROEDORES

4.2.1. Caracterização da Pesquisa e das Áreas de Captura de Roedores

O estudo foi realizado, retrospectivamente, em amostras de soro e tecidos de roedores, acondicionadas no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses - LHR /IOC, procedentes de estudos realizados no período de agosto de 2006 a dezembro de 2012, em parceria com o Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios – LABPMR/IOC. As amostras dos roedores incluídas no estudo foram coletadas nas seguintes localidades do estado do Rio de Janeiro (Figura 4.2):

- i) Região Serrana do Estado – os municípios de Teresópolis e Cantagalo;
- ii) Na região sul do Estado - o município de Mangaratiba;
- iii) Fragmentos florestais localizados no Reservatório de Ribeirão das Lajes, município de Pirai;
- iv) Campus Fiocruz Mata Atlântica em Jacarepaguá;
- v) Zona Portuária na região metropolitana do município do Rio de Janeiro;
- vi) Região do Médio Paraíba no sul do Estado – Município de Valença;
- vii) Região Metropolitana do Estado – Município de São Gonçalo

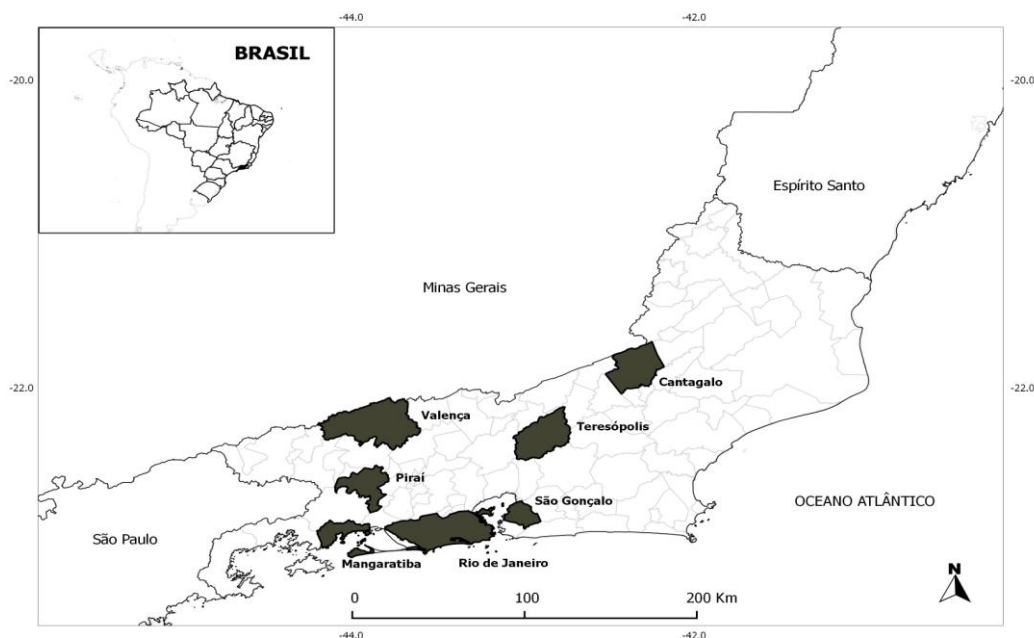


Figura 4.2: Municípios do estado do Rio de Janeiro onde foram coletadas amostras de roedores para a pesquisa de hantavírus.

4.2.2. Captura de Roedores

As amostras de roedores silvestres foram coletadas em parceria com a equipe do Dr. Paulo Sérgio D'Andrea, do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC/FIOCRUZ.

Nas áreas selecionadas, foram estabelecidos transectos lineares com 20 estações de captura em cada. Todos os transectos foram geo-referenciados e nas estações de captura foram dispostas armadilhas do tipo live-trap, modelos Tomahawk (40,64cm x 12,70cm x 12,70cm) e do tipo Sherman (7,62cm x 9,53cm x 30,48cm), apropriadas para a captura de pequenos mamíferos vivos com até 3 Kg. Cada coleta teve duração de cinco noites e a isca utilizada foi uma mistura composta de bacon, aveia, banana e pasta de amendoim (Figura 4.3).



Figura 4.3: Armadilhas utilizadas na captura de roedores, na parte superior armadilha tipo Sherman e na parte inferior armadilha tipo Tomahawk.

Os animais foram processados em um laboratório de campo e as amostras coletadas, segundo normas estritas de biossegurança, com toda a equipe paramentada com equipamentos de nível de biossegurança 3 (filtros motorizados, máscaras com pressão positiva e demais acessórios) que garantem a segurança dos membros da equipe contra zoonoses de transmissão por aerossóis.

Na base laboratorial de campo, os animais foram anestesiados com cloridato de ketamina, conforme orientação veterinária, e tiveram seus dados bionômicos coletados (peso corpóreo e medidas de corpo e cauda), verificados quanto ao sexo e atividade

reprodutiva. A atividade reprodutiva foi constatada pela ocorrência de gestação e pelo estado de desenvolvimento do útero nas fêmeas de roedores; e nos machos pela posição dos testículos (escrotais ou abdominais). A idade dos animais foi estimada por análises de crânio e pelo peso corpóreo relativo (Anexo 10.1).

4.2.3. Coleta de Material Biológico dos Roedores

Todos os espécimes tiveram seu sangue coletado para o diagnóstico sorológico de infecção por hantavírus. Os animais foram submetidos à coleta de sangue por punção cardíaca, com o uso de seringas de 1-3 ml de acordo com o tamanho do animal. Foram também coletadas amostras de órgãos e vísceras dos espécimes (rim, fígado, baço, pulmão e coração), fixados em nitrogênio líquido para confirmação da infecção por hantavírus, através de diagnóstico molecular e tipagem dos vírus por sequenciamento do RNA viral (Figura 4.4).



Figura 4.4: Coleta de amostras biológicas de roedores silvestres e laboratório de campo para pesquisa de hantavírus.

Amostras de fígado foram também fixadas e preservadas em etanol para estudos moleculares filogenéticos dos animais. Amostras de medula óssea foram obtidas para estudos citogenéticos e realização da cariotipagem. A identificação taxonômica foi baseada na morfologia externa, morfometria craniana e na análise cariotípica.

A eutanásia dos animais foi realizada por exanguinação (sangria total), preferencialmente. Caso não tenha sido constatada a morte do animal, ainda com o animal completamente anestesiado foi realizada inoculação intra-cardíaca de cloreto de potássio 19,1%, numa dosagem de 2 ml/Kg de peso.

Todos os animais coletados foram taxidermizados e seus esqueletos preparados, para serem depositados como material testemunho na coleção científica do Museu Nacional, UFRJ.

4.2.4. Considerações Éticas

A pesquisa obteve a aprovação pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ) sob o número 1-049/08 (Anexo 10.2) para o estudo com população de animais. As expedições realizadas de coleta de animais estão de acordo com licença de captura para todo o território nacional (ICMBIO/IBAMA, licença permanente 13373 e autorizações de coleta números 225/2006 – CGFAU; 084/2007 e IEF/RJ 011/2007) (Anexos 10.3, 10.4 e 10.5).

4.3 – ESTUDO COM A POPULAÇÃO HUMANA

4.3.1. Caracterização da Pesquisa na População Humana e dos Municípios de Estudo.

Com o desenho do estudo na população humana, caracterizado como retrospectivo, dados secundários de casos suspeitos de dengue foram descartados pelo Laboratório Central Noel Nutels (LACEN-RJ), somente as amostras de pacientes procedentes do estado do Rio de Janeiro, coletadas durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2011, foram incluídos no estudo.

4.3.2. Critérios de Inclusão para Pesquisa de Hantavírus.

Amostras de soro e/ou sangue de pacientes com suspeita de dengue e que foram negativas pelo teste sorológico para dengue (Dengue IgM/Elisa Panbio), no período de janeiro de 2010 a junho de 2011, foram selecionadas, após análise criteriosa e cuidadosa das fichas epidemiológicas disponibilizadas pelo Lacen Noel Nutels, sem a identificação nominal do paciente (Anexo 10.6). Os critérios de inclusão no presente estudo foram: amostras de pacientes com história de febre, cefaleia e mialgia procedentes de municípios fluminenses. Quanto à procedência dos pacientes, além dos municípios e áreas de onde havia evidência de circulação de hantavírus - dados obtidos em estudos previamente realizados (Lemos et al., 2003; Lamas et al., 2006; Sobreira et al., 2008; Oliveira et al., 2009) - também foram incluídas amostras de pacientes:

(i) de municípios com evidência sorológica ou molecular de infecção por hantavírus em roedores capturados na primeira etapa de desenvolvimento do presente estudo,

(ii) de municípios fluminenses limítrofes aos municípios com evidência sorológica e molecular de circulação de hantavírus tanto de amostra humana quanto de roedor

(iii) complementarmente, foram incluídas também amostras de pacientes procedentes de nove municípios que fazem fronteira com Minas Gerais e São Paulo, estados com casos da SPH.

(iv) todos os casos fatais, independente dos critérios acima estabelecidos, foram incluídos no estudo.

Foram excluídas do estudo amostras procedentes das regiões não listadas, amostras sem dados demográficos, sem a presença da tríade febre, cefaléia e mialgia, de municípios sem divisa com os estados de São Paulo e Minas Gerais e amostras com volume insuficiente para a realização dos testes.

Assim, para o estudo em população humana, foram selecionadas amostras de vinte e cinco municípios, considerando as Regiões de Governo, segundo Divisão Político-Administrativa (figura 4.5):

- i) Metropolitana – Niterói, Nova Iguaçu, Duque de Caxias e Guapimirim;
- ii) Noroeste Fluminense – Santo Antônio de Pádua, Itaperuna e Porciúncula;
- iii) Baixadas Litorâneas – Cabo Frio e Cachoeira de Macacu;
- iv) Serrana – Teresópolis, Petrópolis, Nova Friburgo, São José do Vale do Rio Preto e Carmo;
- v) Centro-Sul Fluminense – Vassouras, Sapucaia, Três Rios e Paraíba do Sul;
- vi) Médio Paraíba – Valença, Quatis, Barra Mansa, Barra do Piraí e Resende;
- vii) Costa Verde – Paraty e Angra dos Reis.

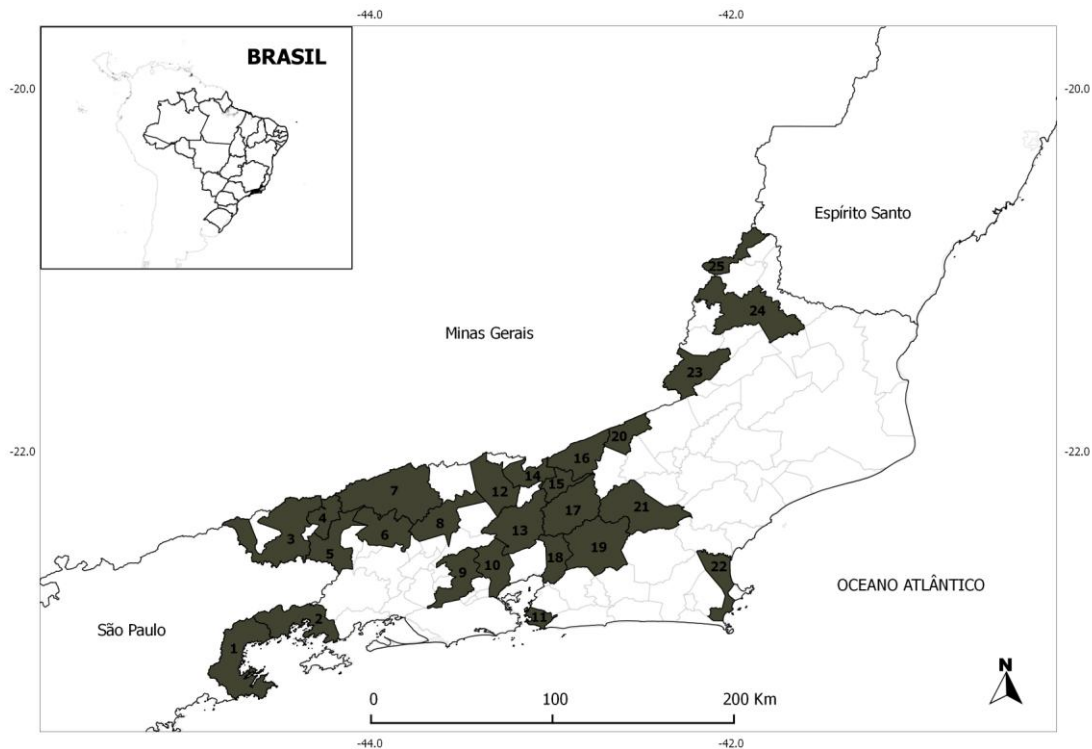


Figura 4.5: Distribuição dos municípios com amostras humanas analisadas no estado do Rio de Janeiro para pesquisa de infecção por hantavírus (janeiro de 2010 a junho de 2011).

4.3.3. Considerações Éticas

O estudo está inserido no projeto “Vigilância Epidemiológica de Hantavíroses e Rickettsioses *lato sensu* dentro do Programa de Vigilância do Ministério da Saúde” e foi submetido ao Comitê Ético em Pesquisa (CEP) Fiocruz/IOC por se tratar de um estudo com seres humanos (CEP 559/10) (Anexo 10.7).

4.4 – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INFECÇÃO POR HANTAVÍRUS.

4.4.1 – IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO (ELISA).

4.4.1.1. Amostras Humanas.

As amostras de soro e/ou sangue foram submetidas ao teste sorológico seguindo os procedimentos preconizados no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses para a pesquisa de anticorpos da classe IgM 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 (5µl da amostra/495 µl da solução de bloqueio). Após nova incubação a 37°C por uma hora e etapa de lavagem por 6 vezes, anticorpos secundários anti-IgM humano conjugado 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 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) ABTS (KPL, USA) foi adicionado e a placa então foi incubada por 20 min 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.

Nas amostras sororreativas para IgM anti-hantavírus, adicionalmente foi realizada a pesquisa de anticorpos da classe IgG utilizando-se o mesmo protocolo mencionado acima, exceto pelo fato de que anticorpos secundários anti-IgG humano conjugado com peroxidase foram utilizados como conjugado na diluição de 1/3000 em solução de bloqueio.

4.4.1.2. Amostras de Roedores

Os soros obtidos de animais silvestres foram submetidos ao imunoenensaio enzimático para detecção de anticorpos anti- hantavírus da classe IgG utilizando o antígeno *Araraquara* fornecido pelo Prof. Dr Luiz Tadeu Figueiredo da USP/Ribeirão Preto, São Paulo (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 subseqüente 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 6 vezes, anticorpos secundários anti-*Peromyscus leucopus* e anticorpos anti-*Rattus rattus* conjugado com peroxidase na diluição de 1/3000 em solução de bloqueio. Em continuação, após incubar e lavar novamente a placa, um substrato cromogênico (o-phenylenediamine = OPD) diluído em solução citrato- fostato (pH 4,9 a 5,2) foi adicionado acrescido de peróxido de hidrogênio e a placa então foi incubada por 15 a 20min a 37°C. Após o bloqueio da placa com adição de HCl a 1M, a absorbância foi mensurada a 490 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.

4.4.2 - TÉCNICAS MOLECULARES.

Considerando que, com exceção da primeira etapa, todos os procedimentos moleculares foram realizados com os mesmos protocolos, uma descrição em conjunto

da análise molecular das amostras humanas e de roedores é apresentada, com exceção do tópico "Extração do RNA Viral" como descrito a seguir.

4.4.2.1. *Extração do RNA viral*

4.4.2.1.1. Amostras Humanas

Para realização da extração do RNA viral em amostras humanas foi utilizado o kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), no qual 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 15s. A solução foi incubada a temperatura ambiente por 10 min. Rapidamente os tubos de 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 (Figura 4.6).

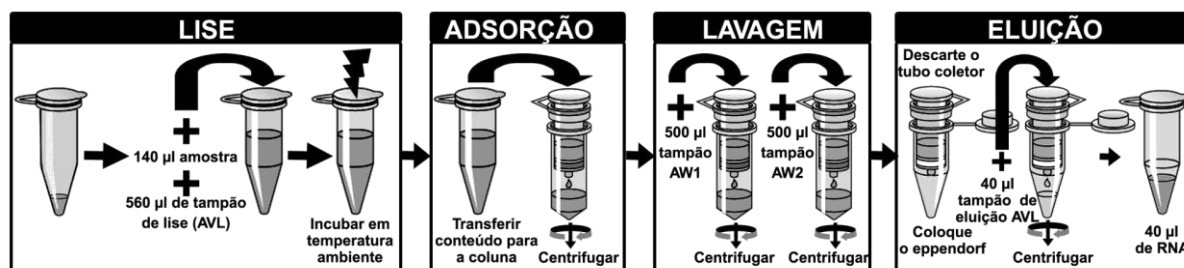


Figura 4.6: Esquema de extração de RNA viral. Fonte: Imagem cedida por Mares-Guia, A. adaptada do Handbook kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN).

4.4.2.1.2. Amostras de Roedores

As amostras de fragmentos de tecidos (pulmão, rim ou fígado) de roedores, previamente identificados como sororreativos, foram submetidas à extração do RNA viral pelo kit comercial PureLink™ (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante, descrito em seguida. Para a extração foram obtidos aproximadamente 50 mg de tecido que foram macerados com um pistilo em banho de nitrogênio líquido (NL), em uma primeira etapa. Em seguida foram adicionados 120µl de Trizol® (Invitrogen) no tubo e o tecido foi macerado complementarmente. Posteriormente, 880µl de Trizol® foram adicionados e após homogeneização em vortex, o material foi incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Na etapa seguinte 200µl de clorofórmio foram adicionados, o tubo agitado por 15 segundos e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000x g por 15 minutos a 4°C, com a transferência, em seguida, de 400µl da fase aquosa para um novo tubo. Uma quantidade de 400µl de etanol a 70% foi adicionada e após homogeneização da amostra em vortex, o tubo foi invertido para dispensar qualquer precipitado. Subsequentemente 700µl da mistura foram transferidos para uma coluna com tubo coletor, submetidos à centrifugação a 12.000x g por 15 segundos à temperatura ambiente e o líquido do tubo coletor foi desprezado e a coluna recolocada no mesmo tubo coletor. Essas etapas foram repetidas a partir da adição de 700µl da mistura. Em sequência, adicionou-se 700µl do tampão de

lavagem I na coluna e centrifugou-se a 12.000x g por 15 segundos à temperatura ambiente, com o descarte do tubo coletor seguido pela colocação da coluna em um novo tubo coletor. Na etapa seguinte, 500µl do tampão de lavagem II foram adicionados na coluna e submetidos à centrifugação a 12.000x g por 15 segundos a temperatura ambiente. O líquido do tubo coletor foi desprezado e a coluna foi recolocada no mesmo tubo coletor. Os passos foram repetidos a partir da adição de 500µl do tampão de lavagem II. Por fim as amostras foram centrifugadas a 12.000x g por um minuto à temperatura ambiente para secagem da membrana com RNA aderido, com posterior descarte do tubo coletor. A coluna foi colocada em um tubo de 1,5mL com adição subsequente de 30µl de água livre de nuclease, seguida da incubação à temperatura ambiente por um minuto e centrifugação da coluna com tubo de 1,5mL a 12.000x g por 2 minutos à temperatura ambiente. O RNA extraído foi alíquotado e armazenado no freezer -80°C.

4.4.2.2. *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™ Reverse Transcriptase One Step (Invitrogen) e de primers específicos para o segmento S viral. Na One Step PCR (752bp), tubos de 0,5 mL foram utilizados para preparar a solução contendo: 0,5 µl (100 pmol/µl) do primer H04-25F (5'- TAGTAGACTCCTTGAKAAGCT – 3') , 0,4 µl (100 pmol/µl) do primer H733-752R (5' – TCWATCCTTTCCATCCARTC – 3') , 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 MgSO₄) de 2X Mix da reação, 8,9 µl de água nuclease-free e 0,2 µl (50mM) de Cloreto de Magnésio (MgSO₄), com um volume total de 23 µl. Esta mistura foi então distribuída em microtubos para PCR (0,2 mL) e então eram acrescentados 2 µl de RNA da amostra, totalizando um volume final de 25 µl. Os tubos foram 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'), 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 (MgSO₄) e 18,9 µl de água nuclease-free, com um volume total de 23 µl. Esta mistura foi distribuída em microtubos para PCR (0,2 mL) na qual foi acrescentado 2 µl do produto da primeira PCR da amostra, com um volume final de 25 µl. Os tubos foram 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.

No caso de um resultado positivo na RT-PCR, foi realizado o seqüenciamento completo do segmento S do genoma viral conforme metodologia descrita por Guterres et al., 2013.

4.4.2.3. *Análise de DNA em gel de agarose*

O gel de agarose a 1,5% foi preparado em tampão TBE 0,5X. Os produtos da PCR foram aplicados no gel e submetidos à eletroforese em tampão TBE 1X. A visualização do DNA foi realizada após o gel ter sido submetido ao banho de GelRed™ (Uniscience) durante 10 minutos, através da luz ultravioleta por meio de transluminador.

4.4.2.4. *Purificação e Sequenciamento nucleotídico*

Os DNAs obtidos foram purificados utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA), segundo o protocolo do fabricante. Os fragmentos obtidos na PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5%. As bandas de interesse foram excisadas dos géis, pesadas e transferidas para tubos de 1,5 mL. O tampão de solubilização (PROMEGA) foi adicionado a cada tubo na proporção de 10µl/10mg de gel e incubados a 65°C até estar completamente dissolvido. A mistura foi então colocada na coluna disposta sobre os tubos coletores de 2,0 mL, incubados por

um minuto à temperatura ambiente e centrifugados por um minuto a 16.000x g. Os filtrados foram descartados e, logo em seguida, adicionados 700µl de tampão de lavagem PROMEGA para remover todo resíduo da agarose, seguido de centrifugação por um minuto a 16.000x g e o filtrado descartado. Novamente 500µl de tampão de lavagem foram adicionados com subsequente centrifugação por 5 minutos a 16.000x g. Uma nova centrifugação de 1 minuto a 16.000x g foi realizada agora sem a tampa interna da centrifuga para total evaporação residual do etanol. As colunas foram transferidas para tubos de 1,5mL estéreis e identificados. Em uma nova etapa foram adicionados 50µl de água livre de nuclease (PROMEGA), seguida de incubação por um minuto à temperatura ambiente e centrifugação a 16.000x g por um minuto. A coluna foi descartada e o filtrado, contendo o DNA a ser sequenciado, foi estocado a -20°C. O DNA purificado foi submetido ao sequenciamento utilizando o kit comercial BigDye® Terminator™ v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). O volume final de cada reação foi de 20µl, contendo: (i) DNA purificado a ser sequenciado, na concentração de 100-200ng; (ii) 3,2 pmol dos primers senso e antisense (utilizado separadamente), (iii) 2µl da mistura Big Dye terminator e (iv) 3µl de tampão fornecido pelo kit. O protocolo foi seguido, segundo o fabricante, e a reação foi processada em um termociclador 9700 GeneAmp® sob as seguintes condições: 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. As sequências nucleotídicas foram obtidas em sequenciador automático, modelo ABI PRISM® 3130x (Applied Biosystems).

4.4.2.5. *Análise do Sequenciamento*

As sequências de nucleotídeos e seus eletroferogramas de sequenciamento dos fragmentos amplificados do segmento genômico S foram analisados por meio do programa MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011). Inicialmente as sequências foram analisadas contra o banco de sequências depositadas no GenBank utilizando a ferramenta BLASTn. Em seguida, as sequências obtidas foram manipuladas no programa MEGA 5.0. Após a localização dos iniciadores por meio dos quais o fragmento foi inicialmente amplificado, as sequências foram alinhadas entre si por meio da ferramenta MUSCLE (Edgar, 2004) no programa MEGA 5.0. Uma sequência consenso foi estabelecida, e as divergências de nucleotídeos entre as sequências foram esclarecidas pela análise dos eletroferogramas de sequenciamento.

4.4.2.6. *Análise Filogenética*

Para todas as análises filogenéticas realizadas, as sequências obtidas no sequenciamento e as obtidas em bancos de sequências foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE (Edgar, 2004) no programa Seaview4 (Gouy et al., 2010). As relações filogenéticas foram estimadas pelo método de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) implementado em MrBayes v3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), usando o modelo GTR+G de substituição de nucleotídeos. As configurações MCMC consistiam em duas corridas simultâneas independentes, com quatro cadeias cada, que foram executadas por 10 milhões de gerações e amostrados a cada 100 gerações, produzindo 100 mil árvores. Depois de eliminar 25% das amostras como “burn-in” uma árvore consenso foi construída. O suporte estatístico dos cladogramas foi medido pelo teste de razão de verossimilhança aproximada (Anisimova & Gascuel, 2006) e as probabilidades posteriores bayesianas. Para as análises, sequências do vírus Haantan (NC005218) e do vírus Seoul (AY027040) foram utilizadas como grupo externo.

4.5– ANÁLISE ESTATÍSTICA.

A prevalência de infecção por hantavírus, tanto em amostras humanas quanto em amostras de roedores, foi avaliada dividindo-se o número de amostras sororreativas pelo número total de amostras analisadas. Foram calculadas a média, o desvio padrão, a mediana e os valores mínimo e máximo da idade dos pacientes e do tempo decorrido entre os primeiros sintomas e a coleta de material para análise. A comparação da proporção de homens e mulheres sororreativos foi testada através do Teste exato de Fisher no programa R (R Studio versão 0.97.551).

5 – RESULTADOS

5.1 – POPULAÇÃO HUMANA

5.1.1. PERFIL DA POPULAÇÃO HUMANA

Um total de 497 amostras humanas do estado do Rio de Janeiro foi selecionado para o estudo. As amostras do ano de 2010 apresentaram uma frequência de 74,04% enquanto que as do ano de 2011 a frequência foi de 25,95%. Valença foi o município que apresentou o maior número de amostras (Tabela 5.1). Com um total de 105 amostras analisadas, a faixa etária com maior número de amostras analisadas foi a de 20–29 anos, sendo as amostras de pacientes do sexo feminino as mais frequentes (Tabela 5.2).

Tabela 5.1: Total de amostras humanas IgM negativas para dengue e a frequência por município e ano de ocorrência no Estado do Rio de Janeiro.

Municípios	Nº de amostras		Total	%
	2010	2011		
Angra dos Reis	1	0	1	0,2
Barra do Piraí	3	1	4	0,8
Barra Mansa	25	25	50	10,1
Cabo Frio	1	0	1	0,2
Cachoeira de Macacu	2	1	3	0,6
Carmo	1	0	1	0,2
Duque de Caxias	1	0	1	0,2
Guapimirim	3	2	5	1
Itaperuna	2	3	5	1
Niterói	1	0	1	0,2
Nova Friburgo	20	34	54	10,9
Nova Iguaçu	0	1	1	0,2
Paraíba do Sul	1	0	1	0,2
Paraty	60	0	60	12,1
Petrópolis	7	1	8	1,6
Porciúncula	4	0	4	0,8
Quatis	1	8	9	1,8
Resende	4	0	4	0,8
S. José do Vale do Rio Preto	16	0	16	3,2
Santo Antônio de Pádua	27	0	27	5,4
Sapucaia	0	1	1	0,2
Teresópolis	0	2	2	0,4
Três Rios	0	1	1	0,2
Valença	156	10	166	33,4
Vassouras	32	39	71	14,3
Total	368	129	497	100

Tabela 5.2: Número de amostras por faixa etária e sexo em relação ao ano de coleta.

Faixa Etária/Sexo	2010			2011				Total			
	Masc	Fem	Total	Masc	Fem	Ign	Total	Masc	Fem	Ign	Total
<1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	-	1
1 - 9	7	11	18	9	4	0	13	16	15	-	31
10 -19	25	31	56	16	13	0	29	41	44	-	85
20 -29	44	38	82	7	16	0	23	51	54	-	105
30 -39	33	54	87	4	8	0	12	37	62	-	99
40 -49	27	25	52	9	8	0	17	36	33	-	69
50 -59	21	26	47	7	5	0	12	28	31	-	59
60 -69	6	11	17	3	3	0	6	9	14	-	23
70 -79	4	4	8	2	0	0	2	6	4	-	10
80 e +	3	2	5	1	1	0	2	4	3	-	7
Ignorado	0	0	0	2	2	4	8	2	2	4	8
Total	170	202	372	60	61	4	125	230	263	4	497

As características relacionadas com a faixa etária, gênero e tempo decorrido entre os primeiros sintomas e a coleta de material para análise em relação ao sexo das amostras humanas utilizadas no estudo são apresentadas nas tabelas 5.3 e 5.4.

Tabela 5.3: Cálculo da média, do desvio padrão, da mediana e os valores mínimo e máximo da idade dos pacientes em relação ao sexo dos casos utilizados no estudo.

Idade	Mulheres	Homens
Média ± Desvio Padrão	33,6 ± 17,5 anos (n = 261)	33,4 ± 18,4 anos (n = 227)
Mínimo	1 mês	1 ano
Máximo	92 anos	83 anos
Mediana	32 anos	32 anos

Tabela 5.4: Cálculo da média, do desvio padrão, da mediana e os valores mínimo e máximo do tempo decorrido entre os primeiros sintomas e a coleta de material para análise em relação ao sexo dos casos utilizados no estudo.

Tempo decorrido entre as primeiras manifestações clínicas e a coleta de material para análise.	Mulheres	Homens
Média ± Desvio Padrão	9 ± 8 dias (n = 241)	8 ± 7 dias (n = 199)
Mínimo	1 dia	1 dia

Máximo	67 dias	61 dias
Mediana	7 dias	6 dias

As manifestações clínicas mais frequentes apresentadas na população estudada foram: febre (91,95%), cefaleia (87,32%) e mialgia (82,69%), seguidos de prostração (72,23%) e artralgia (69,41%). Outras manifestações clínicas menos frequentes, porém não menos importantes, foram: dor retro orbitária (60,36%), náuseas (56,54%), anorexia (48,89%), vômitos (33,60%), diarreia (28,37%), prurido (17,7%), exantema (16,49%), dor abdominal (3,02%) e manifestações hemorrágicas (2,81%).

5.1.2. TESTES SOROLÓGICOS E MOLECULARES PARA HANTAVÍRUS

Das amostras analisadas no estudo, cinco (05) apresentaram anticorpos da classe IgM anti-hantavírus, representando 1% do total de amostras analisadas sendo 4 (0,8%) do ano de 2010 e 1 (0,2%) do ano de 2011. As amostras sororreativas, com os seguintes dados epidemiológicos apresentados nas fichas epidemiológicas disponibilizadas pelo LACEN/RJ, estão apresentadas na Tabela 5.4.

Entre as amostras sororreativas, 0,6% (n=3) foram do município de Valença, 0,2% (n=1) do município de Vassouras e 0,2% (n=1) do município de Nova Friburgo (Figura 5.1).

Tabela 5.5: Dados clínico-epidemiológicos de casos suspeitos de dengue, mas soronegativos, cujas amostras foram reativas para hantavírus no estado do Rio de Janeiro (2010-2011).

Amostras Reativas	Ano	Sexo	Idade	Município	Dias de doença/ 1ª coleta	Sintomas
LHP 0088/13	2010	F	13	Valença	8 dias	Febre, cefaléia, mialgia, artralgia, náuseas, prostração, dor retro orbitária e anorexia.
LHP 0126/13	2010	F	18	Valença	10 dias	Febre, cefaléia, mialgia, náuseas, prostração, dor retro orbitária, anorexia e exantema.
LHP 0323/13*	2010	F	10	Valença	3 dias	Febre, cefaléia, artralgia, náuseas, diarreia, prostração, dor retro orbitária, anorexia, prurido e exantema.
LHP 0483/13	2010	F	76	Nova Friburgo	10 dias	Mialgia, artralgia, prostração e anorexia.
LHP 0550/13	2011	M	12	Vassouras	2 dias	Febre, náuseas e dor retro orbitária.

*Todas as amostras sororreativas para hantavírus foram submetidas à pesquisa de NS1 e apenas a amostra LHP 0323/13 foi positiva pelo kit Platelia Dengue NS1/BioRad.

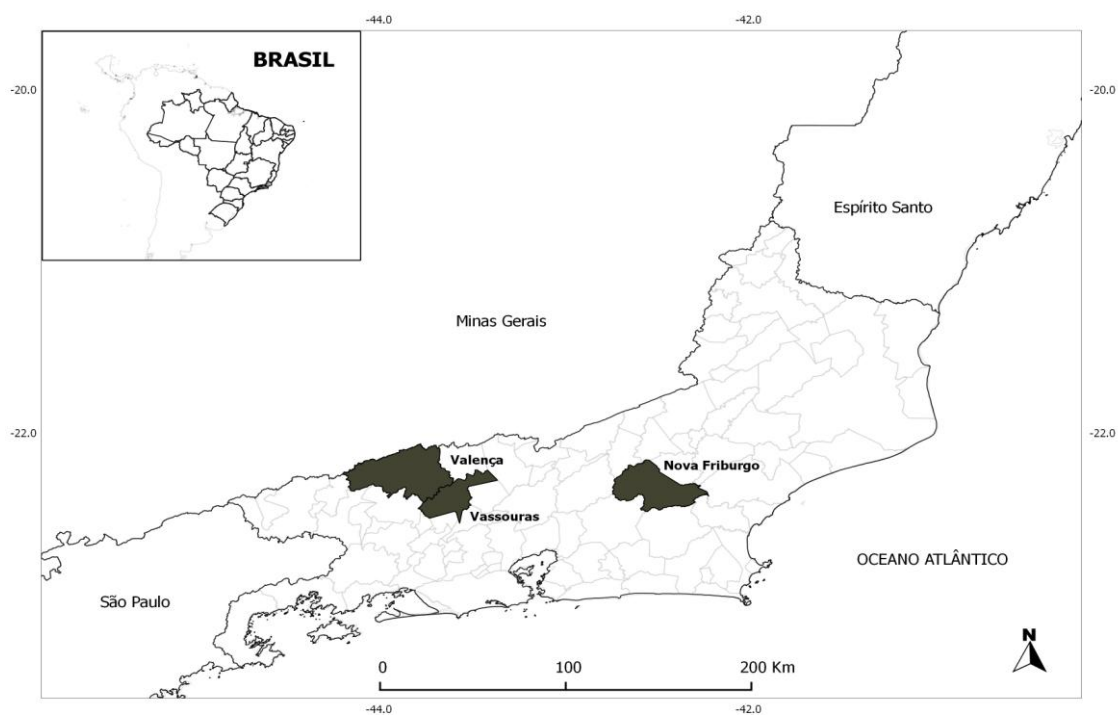


Figura 5.1: Municípios do estado do Rio de Janeiro com amostras de casos humanos sororreativas para hantavírus.

Em relação ao total de amostras por município, as amostras sororreativas representaram 1,8% (3/166) no município de Valença, 1,4% (1/71) no município de Vassouras e 1,85% (1/54) no município de Nova Friburgo.

Das cinco amostras sororreativas, 0,8% (4/497) foram do sexo feminino e 0,2% (1/497) foi do sexo masculino.

Nenhuma das amostras reativas para anticorpos da classe IgM anti-hantavírus apresentou sororreatividade para anticorpos IgG anti-hantavírus, bem como para os testes moleculares, não sendo possível a detecção do RNA viral.

Para avaliar a diferença entre homens e mulheres sororreativos (Mulheres = 4/263; Homens = 1/230), foi realizado o teste exato de Fisher, porém não houve diferença significativa entre mulheres e homens sororreativos (Teste exato de Fisher $p = 0,3781$).

5.2 - POPULAÇÃO DE ROEDORES.

5.2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ROEDORES CAPTURADOS

Foram coletados 235 espécimes de roedores neste estudo. Pelo menos dezessete espécies pertencentes a treze gêneros foram identificadas: 10 Sigmodontinae - *Akodon*, *Calomys*, *Euryoryzomys*, *Necromys*, *Nectomys*, *Oligoryzomys*, *Oxymycterus*, *Brucepattersonius*, *Trinomys* e *Delomys*; 02 Murinae - *Mus* e *Rattus*; e 01 *Ecethizontidae* – *Sphiggurus* (Tabela 5.5). A Tabela 5.5 mostra que as espécies *Rattus norvegicus* (96), seguida de *Akodon cursor* (27), *Akodon* sp. (21) e *Oligoryzomys nigripes* (20) foram as mais abundantes.

Em consequência da má qualidade e de ausência de metáfases para análise molecular para identificação de amostras a nível específico, alguns roedores só puderam ser identificados até o nível genérico, sendo assim, algumas espécies do gênero *Akodon*, *Brucepattersonius*, *Delomys*, *Oligoryzomys*, *Oxymycterus* e *Trinomys* permaneceram identificados como *Akodon* sp., *Brucepattersonius* sp., *Delomys* sp., *Oligoryzomys* sp., *Oxymycterus* sp. e *Trinomys* sp..

Dos 235 roedores coletados no estudo, 96 foram fêmeas e 139 foram machos, a relação por espécie coletada está demonstrada na Tabela 5.6.

Tabela 5.6: Relação número de roedores capturados por espécie e os municípios estudados do Estado do Rio de Janeiro.

Espécies	Municípios							Total	%
	Cordeiro	Mangaratiba	Valença	Rio de Janeiro	São Gonçalo	Teresópolis	Piraí		
Sigmodontinae									
<i>Akodon cursor</i>	10		13				4	27	11,49%
<i>Akodon montensis</i>	2					6		8	3,40%
<i>Akodon lindberghi</i>			3					3	1,27%
<i>Akodon sp.</i>		13	7			1		21	8,93%
<i>Brucepattersonius sp.</i>	1							1	0,42%
<i>Calomys tener</i>			1					1	0,42%
<i>Delomys dorsalis</i>						17		17	7,23%
<i>Delomys sp.</i>						3		3	1,27%
<i>Euryoryzomys russatus</i>		1					2	3	1,27%
<i>Necomys lasiurus</i>	2							2	0,85%
<i>Necomys squamipes</i>	1						2	3	1,27%
<i>Oligoryzomys flavescens</i>			1					1	0,42%
<i>Oligoryzomys nigripes</i>		2	12				6	20	8,51%
<i>Oligoryzomys sp.</i>			1					1	0,42%
<i>Oxymycterus dasythricus</i>							6	6	2,55%
<i>Oxymycterus sp.</i>			2					2	0,85%
<i>Trinomys dimidiatus</i>						4		4	1,70%
<i>Trinomys sp.</i>		1						1	0,42%
Murinae									
<i>Rattus norvegicus</i>				3	93			96	40,85%
<i>Rattus rattus</i>				1	3			4	1,70%
<i>Mus musculus</i>			9		1			10	4,25%
Ecethizontidae									
<i>Sphiggurus villosus</i>							1	1	0,42%
Total	16	17	49	4	97	31	21	235	100%

Tabela 5.7: Distribuição de fêmeas e machos por espécie e por municípios estudados do estado do Rio de Janeiro.

Espécies	Municípios							
	Cordeiro	Mangaratiba	Valença	Rio de Janeiro	São Gonçalo	Teresópolis	Piraí	Total
Sigmodontinae								
<i>Akodon cursor</i>	5F/5M		7F/6M				2F/2M	14F/13M
<i>Akodon montensis</i>	2M					3F/3M		3F/5M
<i>Akodon lindberghi</i>			1F/2M					1F/2M
<i>Akodon sp.</i>		3F/10M	2F/5M			1M		5F/16M
<i>Brucepattersonius sp.</i>	1F							1F
<i>Calomys tener</i>			1M					1M
<i>Delomys dorsalis</i>						9F/8M		9F/8M
<i>Delomys sp.</i>						3M		3M
<i>Euryoryzomys russatus</i>		1M					1F/1M	1F/2M
<i>Necomys lasiurus</i>	2M							2M
<i>Nectomys squamipes</i>	1F						1F/1M	2F/1M
<i>Oligoryzomys flavescens</i>			1M					1M
<i>Oligoryzomys nigripes</i>		1F/1M	3F/9M				5F/1M	9F/11M
<i>Oligoryzomys sp.</i>			1M					1M
<i>Oxymycterus dasythricus</i>							2F/4M	2F/4M
<i>Oxymycterus sp.</i>			2M					2M
<i>Trinomys dimidiatus</i>						4F		4F
<i>Trinomys sp.</i>		1M						1M
Murinae								
<i>Rattus norvegicus</i>				1F/2M	39F/54M			40F/56M
<i>Rattus rattus</i>				1F	3M			1F/3M
<i>Mus musculus</i>			4F/5M		1M			4F/6M
Ecethizontidae								
<i>Sphiggurus villosus</i>							1M	1M
Total	7F/9M	4F/13M	17F/32M	2F/2M	39F/58M	18F/19M	11F/10M	96F/139M

5.2.2. TESTES SOROLÓGICOS PARA HANTAVÍRUS EM ROEDORES

De todas as amostras de soro submetidas ao ensaio imunoenzimático (ELISA) IgG utilizando-se o antígeno Araraquara, apenas uma apresentou reatividade com título de 1:400. A prevalência foi de 0,42% (1/235) de anticorpos da classe IgG anti-hantavirus nos roedores estudados.

O roedor infectado da espécie *O. nigripes* foi capturado no município de Valença (ambiente rural), no distrito de Conservatória (Figura 5.2). Capturado numa armadilha tipo Sherman, o espécime apresentou os seguintes dados bionômicos: peso de 25 gramas, escrotado, exibindo cicatriz na orelha e ectoparasitas. O mesmo encontra-se depositado na coleção zoológica do laboratório com o esqueleto completo preparado e pele taxidermizada.

O espécime de *O. nigripes* sororreativo representou 5% (1/20) de *O. nigripes* analisados neste estudo.

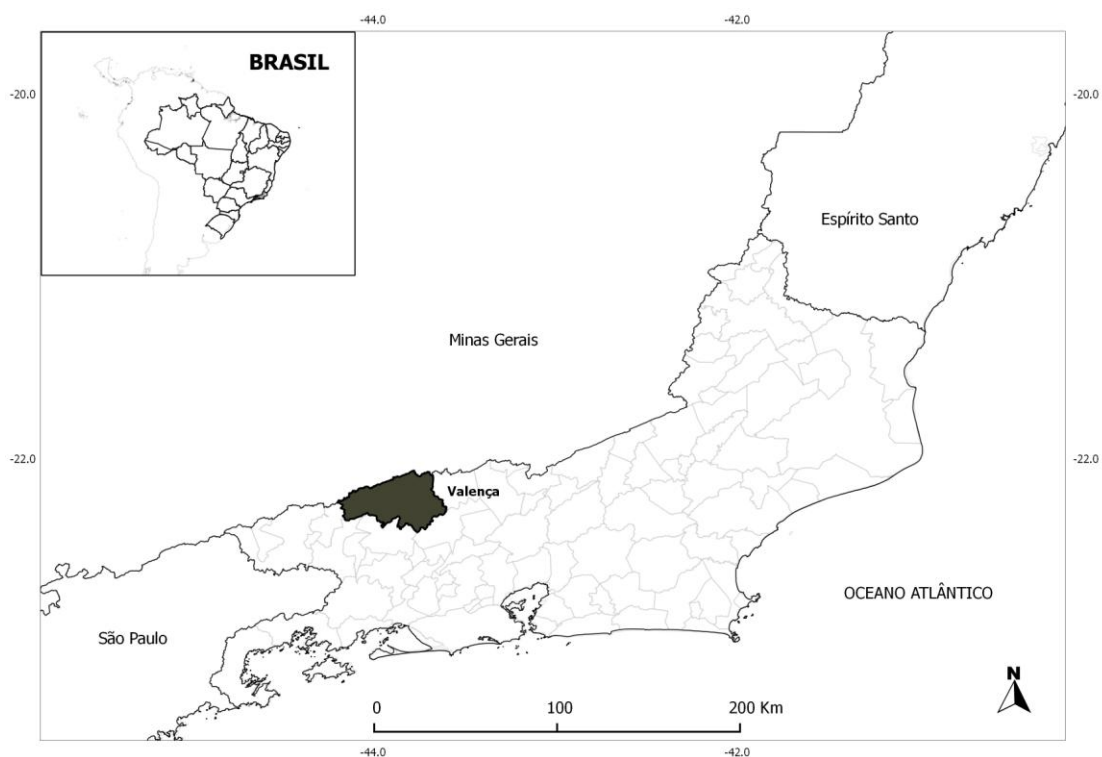


Figura 5.2: Município do estado do Rio de Janeiro onde foi encontrado o roedor *O. nigripes* infectado por hantavírus.

5.2.3. DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL E ANÁLISE FILOGENÉTICA

A análise molecular pelo método RT-PCR e o sequenciamento possibilitaram o sequenciamento completo do segmento S (903 nt) e a detecção da variante viral *Juquitiba* (Nº de acesso GenBank KC422348) como responsável pela infecção deste espécime (Figura 5.3).

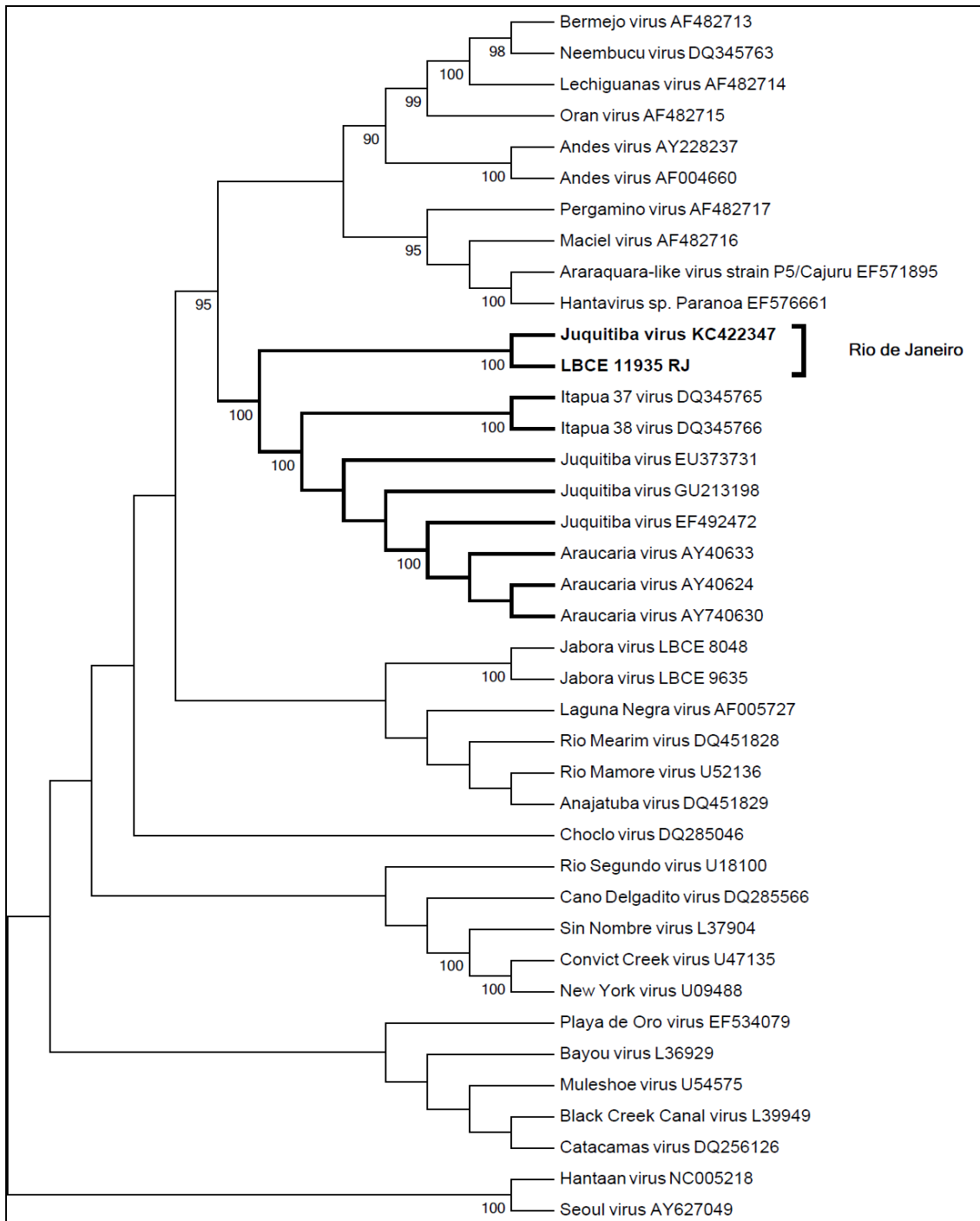


Figura 5.3: Análise filogenética entre hantavírus com base em uma análise bayesiana de distâncias genéticas baseada na análise do gene da proteína do nucleocapsídeo (903 nts). O valor numérico no nó indica a probabilidade posterior (pp) replicada que apoiou o ramo interior. A espécie ou cepa viral e o número de acesso no GenBank está ao lado dos vírus relacionados na árvore filogenética.

6 – DISCUSSÃO

Desde os primeiros relatos em 1993, muitos estudos sobre a SPH vêm se intensificando, fato que tem possibilitado um aumento significativo do conhecimento desta zoonose. Diversos inquéritos sorológicos de hantavírus em humanos e roedores vêm sendo realizados em todo o mundo e, particularmente no Brasil, mostram o quanto são necessárias mais informações sobre a dinâmica de transmissão, ecologia e taxonomia dos reservatórios, doença e distribuição destes vírus.

Neste trabalho, foram realizados subsequentemente dois estudos que avaliaram amostras de casos humanos e de roedores pelos métodos sorológicos e moleculares para a detecção de hantavírus no estado do Rio de Janeiro. Os resultados obtidos demonstraram a evidência sorológica de infecção por hantavírus em amostras de casos humanos inicialmente suspeitos de infecção por dengue e a detecção da variante viral *Juquitiba* no roedor silvestre *O. nigripes*.

6.1 – DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR HANTAVÍRUS EM ROEDORES DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

Estudos relacionados com reservatórios de hantavírus são de estimada importância para identificar espécies de roedores infectados em áreas de ocorrência de SPH ou simplesmente para identificar áreas em que a doença ainda não foi notificada. Dados adquiridos de sequências nucleotídicas demonstram que os hantavírus relacionados à doença humana estão altamente relacionados com os hantavírus encontrados em roedores que são encontrados nessas localidades (Hjelle et al., 1996; Ahlm et al., 1997; Plyusnin et al., 1997; Hart & Bennett, 1999). Sendo assim, em uma segunda vertente deste estudo se buscou estudar e identificar roedores infectados por hantavírus para tentar compreender o motivo pelo qual não existem casos notificados da doença no estado do Rio de Janeiro.

Em relação às comunidades de pequenos mamíferos, todas as espécies coletadas já eram conhecidas da fauna do estado do Rio de Janeiro (D`Andrea et al., 2007; Bonvicino et al., 2008).

Com exceção do roedor sinantrópico e cosmopolita *Rattus norvegicus* coletado em áreas urbanas do estado do Rio de Janeiro, os roedores silvestres dos gêneros

Akodon e *Oligoryzomys* foram os mais abundantes, estando de acordo com diversos estudos realizados no estado e em áreas de Mata Atlântica (Cherem & Perez, 1996; D`Andrea et al., 1999; Gentile et al., 2000; Dalmagro & Vieira, 2005; D`Andrea et al., 2007; Vaz et al., 2007; Bonecker et al., 2009) que apontam para predominância dessas espécies em áreas antropizadas. Estes roedores são dois dos principais reservatórios de hantavírus no Brasil e muitas vezes são encontrados próximo de habitações humanas (Suzuki et al., 2004; Oliveira et al., 2007).

A espécie *O. nigripes* é encontrada principalmente nos biomas Mata Atlântica e Mata de Araucárias. A distribuição geográfica do roedor *O. nigripes* se estende da porção central, nordeste e sul do Brasil até o Uruguai, o leste do Paraguai e Norte da Argentina (Andrades-Miranda et al., 2001; Weksler & Bonvicino, 2005; Bonvicino et al., 2008; Oliveira et al., 2009).

Roedores da espécie *O. nigripes* não possuem restrição no uso do habitat (Bonvicino et al., 2002). Segundo Dalmagro & Vieira (2005), *O. nigripes* pode ser encontrado em áreas com menor densidade de árvores e cobertura de dossel. O roedor *O. nigripes*, encontrado infectado neste estudo, foi coletado em uma área rural do município de Valença. Alguns trabalhos relatam que esta espécie é abundante em áreas de estágios iniciais de sucessão e em áreas agrícolas, podendo se tornar uma peste em plantações, dada a disponibilidade de alimentos (Rodríguez, 1993; Braga et al., 2009). Esta espécie é também muito encontrada em áreas de borda e em áreas abertas (Umetsu & Pardini, 2007; Puttker et al., 2008). Estes dados salientam o quanto estes roedores estão presentes em áreas de interface entre o ambiente silvestre e o ambiente peridomiciliar/rural, favorecendo assim, o contato do reservatório com o homem.

O roedor encontrado infectado neste estudo era macho escrotado, com peso compatível com um espécime adulto e com cicatrizes na orelha. Segundo alguns autores, a principal forma de transmissão de hantavírus entre os roedores é através de ferimentos oriundos de encontros agonísticos, mais frequentemente observados em machos adultos (Mills et al., 1999; Mills, 2006). Segundo Mills e colaboradores (1999), machos adultos possuem uma maior chance de exposição ao vírus e a outros roedores infectados, pois encontros agonísticos entre machos são mais agressivos do que encontros entre fêmeas. Além disso, estes resultados corroboram a hipótese de que a hantavirose é transmitida entre os roedores de maneira horizontal.

É importante ressaltar que apesar da baixa prevalência de anticorpos anti-hantavírus em roedores (0,42%), este resultado já era esperado segundo trabalhos previamente realizados, na qual a prevalência de anticorpos tem uma variação de 0 – 47%, estando relacionada diretamente com aspectos sazonais, geográficos e das populações de roedores estudadas (Childs et al., 1994; Morzunov et al., 1998; Mills et al., 1999). Desta forma, podemos inferir que, apesar da baixa prevalência, o fato de ser encontrado infectado o roedor considerado reservatório primário do hantavírus patogênico *Juquitiba* e de ser uma espécie comum na região, são dados que apontam a presença do vírus no ambiente e que maiores estudos precisam ser realizados.

Ressaltando este fato, comparando as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos virais com outros hantavírus conhecidos, a sequência completa do vírus obtido de *O. nigripes* infectado, demonstrou o maior grau de identidade (95,7% nt e 99,7% aa) com o vírus Juquitiba-like Oln6470 (Nº de acesso GenBank KC422347) variante do município de Teresópolis, um hantavírus previamente caracterizado no estado do Rio de Janeiro, sugerindo a presença de uma única linhagem circulante nesta região.

Ainda que o estado do Rio de Janeiro não tenha notificado nenhum caso da SPH, a circulação do hantavírus patogênico *Juquitiba* em roedores silvestres e a evidência sorológica em amostras humanas, apontam a necessidade de um maior conhecimento da doença entre os setores de saúde pública para auxiliar no diagnóstico diferencial no contexto do sistema de vigilância epidemiológica em nosso estado e no Brasil.

De acordo com Mills & Childs (1998), a circulação de hantavírus depende diretamente da dinâmica populacional de roedores reservatórios, ou seja, o vírus pode ser extinto da população periodicamente, mas seria reintroduzido a partir do contato com espécimes infectados de populações vizinhas (Oliveira et al., 2009). Corroborando com este fato, também foi relatado que a baixa abundância relativa na dinâmica populacional de *O. nigripes*, com um número de animais muito diminuído em determinadas épocas do ano, também é um padrão observado em outras áreas de Mata Atlântica (Graipel et al., 2006; Bonecker et al., 2009; Teixeira et al., 2014). Provavelmente, essa baixa frequência e instabilidade em populações de *O. nigripes* desempenham um papel importante para a manutenção do vírus em baixa frequência.

6.2 – INVESTIGAÇÃO E DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR HANTAVÍRUS EM AMOSTRAS DE CASOS HUMANOS IgM NEGATIVAS PARA DENGUE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

Apesar do estado do Rio de Janeiro ainda não possuir casos notificados da SPH, existem evidências que sugerem que o estado é uma potencial área de circulação da doença. Estudos prévios realizados no estado já demonstraram evidências de infecção por hantavírus em pacientes com outros diagnósticos clínicos (Lemos et al., 2003; Lamas et al., 2013; Oliveira et al., 2009). É importante ressaltar que o estado do Rio de Janeiro faz fronteira com dois dos estados brasileiros nos quais a incidência da doença é alta, Minas Gerais e São Paulo (Ministério da Saúde, 2009).

Corroborando com estes fatos, as amostras humanas sororreativas para anticorpos da classe IgM anti-hantavírus neste estudo foram oriundas dos municípios de Valença, onde foi verificada a presença do roedor silvestre *O. nigripes* reativo; Vassouras, município limítrofe à Valença, e Nova Friburgo, que é um município vizinho de Teresópolis, uma localidade previamente estudada por Oliveira e colaboradores em 2009, onde o vírus foi detectado e identificado previamente, mostrando a íntima relação entre a distribuição do reservatório e a dinâmica de transmissão dos hantavírus (Oliveira et al., 2009).

Cabe ressaltar que o município de Valença é uma localidade de transição, pois é um município limítrofe ao estado de Minas Gerais, estado brasileiro com maior número de casos da SPH. Assim, de acordo com os dados observados no presente estudo, é possível que casos da doença, não estejam sendo diagnosticados devido, entre outros fatores, à semelhança clínica da SPH com outras doenças infecciosas febris como a dengue, por exemplo.

Embora uma das limitações do nosso estudo tenha sido que as amostras humanas selecionadas para análise tinham que, como critério principal, possuir sorologia IgM negativa para dengue, é imprescindível reforçar que o teste NS1 foi instituído no LACEN Noel Nutels somente em 2011, fato que determinou a sua não inclusão nos critérios de seleção. Assim, considerando a dificuldade de interpretação do teste sorológico para dengue, no contexto das infecções primárias e as secundárias pelos diferentes sorotipos, todas as amostras que apresentaram anticorpos anti-hantavírus foram submetidas à

pesquisa de NS1 no Laboratório de Referência Regional para dengue no Instituto Oswaldo Cruz.

Com a pesquisa de NS1 nas cinco amostras sororreativas, foi possível identificar, a amostra LHP0323/13 que ELISA IgM negativa, foi NS1 reagente. A explicação para este resultado pode estar na cinética de anticorpos na infecção pelos DENV. Os títulos séricos de anticorpos da classe IgM aparece em uma infecção primária ou secundária por volta do sexto dia de doença, após o aparecimento dos sintomas. No entanto em uma infecção secundária, os títulos de IgM se encontram mais baixos que na primária, atingindo seu pico por volta de duas semanas (Nogueira et al., 1992). Em contrapartida, a proteína NS1 é secretada na corrente sanguínea desde o aparecimento dos sintomas sendo detectável até o quinto ou sexto dia (Guzman et al., 2010; Andries et al., 2012). Sendo a amostra do paciente coletada no terceiro dia de doença, dentro do período detectável da proteína não estrutural, a hipótese desta amostra ter apresentado uma reação cruzada com dengue não pode ser descartada. Entretanto, não podemos desconsiderar a hipótese de ocorrer uma co-infecção, dado que, em momentos de grande epidemia, não raramente quadros oligossintomáticos ou mesmo infecções subclínicas de dengue podem ocorrer e a SPH, pela similaridade clínica, não ser identificada por falta de uma investigação laboratorial.

Em relação às amostras reagentes para anticorpos IgM anti-hantavírus, LHP0088/13, LHP0126/13 e LHP0483/13, elas foram coletadas entre o 8^o e 10^o dias de doença, fato que, considerando a cinética de anticorpos para dengue, na qual anticorpos IgM já seriam detectáveis, praticamente descarta a possibilidade de serem amostras de pacientes com dengue. Da mesma forma, embora coletada dois dias após o início dos sintomas, a amostra LHP0550/13 foi ELISA IgM e NS1 negativa, afastando, praticamente a possibilidade de dengue. A complementação da análise laboratorial, a partir da pesquisa de anticorpos da classe IgG, poderia dar maior robustez aos resultados obtidos.

Apesar de não ser o tema principal deste estudo, diante do exposto, é de extrema importância que testes laboratoriais sejam utilizados de maneira conjunta para se obter um diagnóstico de dengue mais conclusivo e com menos viés de interpretação, eliminado assim a possibilidade de resultados falso-negativos. Assim, a utilização de testes NS1 e IgG na rotina diagnóstica, além do teste IgM, diminuiria a limitação de diagnóstico da doença em sua fase inicial e em sua fase mais tardia, além de infecções

secundárias, já que são testes que não necessitam de equipamentos sofisticados e possibilitam uma análise rápida de um grande número de amostras.

Embora tenha sido detectada a presença de anticorpos anti-hantavírus em amostras humanas, não foi possível a detecção do RNA viral pelas técnicas moleculares, muito possivelmente devido à conservação inadequada e à manipulação com sucessivo descongelamento e congelamento das amostras, uma vez que as mesmas seriam descartadas e o RNA, muito sensível, teria se degradado.

A partir da análise das sequências completas de duas amostras de roedores, na qual é possível verificar que o hantavirus Juquitiba (JUQV) se encontra em uma clade separada dos restante dos outros JUQV identificados no Brasil, em associação com a evidência sorológica de infecção humana por hantavírus, é preciso verificar, entre outras hipóteses, se a variante viral *Juquitiba* presente no estado do Rio de Janeiro está associada com manifestações clínicas mais brandas do que as relatadas em outros estados por outras linhagens da mesma variante. Esta hipótese passa a ser reforçada a partir da análise dos sinais e sintomas dos pacientes reativos, já que não houve gravidade em suas manifestações clínicas.

Adicionalmente, é importante destacar o fato de que o paciente LHP0126/13 apresentou exantema, um dado não compatível com as manifestações clínicas encontradas na SPH, nas quais se observa mais frequentemente febre, mialgia, cefaleia, mal-estar associadas com manifestações gastrointestinais. No entanto, a informação da presença de comprometimento respiratório da SPH, como dado mais específico, não se encontra contemplada na ficha epidemiológica da dengue. Assim, como as amostras utilizadas neste estudo foram provenientes da investigação inicial de dengue, as fichas epidemiológicas disponibilizadas contemplavam as manifestações mais frequentes para esta virose não existindo, conseqüentemente, dados mais específicos para outros agravos, como a SPH, fato que influenciou, assim como o teste laboratorial utilizado pelo Lacen Noel Nutels, a construção dos critérios de inclusão de amostras neste estudo.

Com os resultados obtidos é possível especular que a ausência de casos humanos de hantavirose no estado do Rio de Janeiro pode estar associada à circulação de vírus de baixa virulência, às baixas taxas de transmissão entre os roedores e/ou ao não reconhecimento de casos da SPH pelos sistemas de saúde, já que esta doença pode ser confundida com outras que também apresentam a clínica semelhante com

comprometimento cardiopulmonar, como pneumonias e outras viroses, como dengue e influenza, que são doenças bastante comuns (Ministério da Saúde, 2009).

Apesar da impossibilidade de caracterização viral, a partir das amostras humanas sororreativas, a evidência sorológica em cinco amostras de pacientes no estado fluminense em associação com a presença de roedores silvestres infectados com hantavírus *Juquitiba*, variante patogênica associada com o maior número de casos de SPH no Brasil, reforçam a importância de se realizar estudos de soroprevalência em humanos e em roedores para a obtenção de maiores informações no que concerne a falta de casos humanos notificados nesta região. Finalmente, os resultados obtidos, não somente confirmam que o hantavírus *Juquitiba* circula no estado do Rio de Janeiro, mas essencialmente apontam, sob o ponto de vista da saúde pública, a necessidade de uma vigilância sindrômica febril, especialmente em áreas onde sabidamente circulam roedores infectados por hantavírus.

7- CONCLUSÕES

- Anticorpos anti-hantavírus da classe IgM foram detectados em cinco das 497 amostras de pacientes IgM negativos para dengue, nos municípios de Valença, Vassouras e Nova Friburgo, corroborando com dados prévios no estado do Rio de Janeiro.
- Não foi possível detectar a presença de RNA viral nas amostras humanas sororreativas para hantavírus nos testes moleculares, provavelmente devido à conservação e à refrigeração inadequadas das mesmas.
- A identificação molecular de Jucitiba em *O. nigripes* infectado confirma a importância da realização dos estudos eco-epidemiológicos e reforça, diante também da presença de evidência de infecção humana por hantavírus, a possibilidade de ocorrência da SPH no estado do Rio de Janeiro
- A identificação da variante viral *Jucitiba* na espécie *O. nigripes* está em concordância com a literatura, visto que este roedor silvestre se encontra distribuído no bioma Mata Atlântica
- A análise do sequenciamento completo do segmento S da variante viral encontrada no presente estudo, na qual foi possível identificar que está intimamente relacionada com uma variante previamente identificada no estado, isolada das outras variantes, sugere a presença de uma única linhagem circulante nesta região.
- Os dados obtidos sugerem a necessidade e a importância de se realizar estudos para a pesquisa de anticorpos tanto em populações de roedores quanto na população humana com o objetivo de auxiliar a vigilância epidemiológica da SPH no estado do Rio de Janeiro

8 – PERSPECTIVAS

- Realizar um estudo prospectivo em áreas de vigilância e áreas com circulação de roedores reservatórios infectados, para garantir a qualidade das amostras coletadas e poder identificar molecularmente a(s) variante(s) viral(is) associada(s) a casos clínicos e circulantes no estado do Rio de Janeiro.
- Colaborar com a vigilância da SPH no estado do Rio de Janeiro com mais informações investigativas e ecoepidemiológicas sobre a circulação do vírus no estado.
- Realizar o diagnóstico diferencial com outras amostras de casos suspeitos de dengue procedentes do estado do Rio de Janeiro que não foram incluídas no estudo.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abbott KD, Ksiazek TG, Mills JN 1999. Long-term hantavírus persistence in rodent populations in Central Arizona. *Emerg Infect Dis* 5: 102-112.

Ahlm C, Alexenyev OA, Elgh F, Aava B, Wadell G, Tarnvik A et al. 1997. High prevalence of hantavirus antibodies in Bank voles (*Clethrionomys glareolus*) captured in the vicinity of households afflicted with Nephropathia epidemica. *Am J Trop Med Hyg* 56: 674-678.

Andrades-Miranda j, Oliveira LFB, Lima-Rosa CAV, Nunes AP, Zanchin NIT, Mattevi MS 2001. Chromosome studies in seven species of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) from Brazil. *J Mammal* 82:1080-1091.

Andries AC, Duong V, Ngan C, Ong S, Huy R, Sroin KK, Te V, Y B, Try PL, Buchy P 2012. Field evaluation and impact on clinical management of a rapid diagnostic kit that detects dengue NS1, IgM and IgG. *PloS Negl Trop Dis* 6:1993.

Anisimova M, Gascuel O 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic biology* 55: 539–552.

Arai S, Song JW, Sumibcay L, Bennett SN, Nerurkar VR, Parmenter C, Cook JA, Yates TL & Yanagihara R 2007. Hantavirus in northern short-tailed shrew, United States. *Emerg Infect Dis* 13: 1420-1423.

Badra SJ, Maia FGM, Figueiredo GG, Junior S, Campos GM, Figueiredo LTM, & Passos ADC 2012. A retrospective serologic survey of hantavirus infections in the county of Cássia dos Coqueiros, State of São Paulo, Brazil. *Ver Soc Bras Med Trop* 45: 468-470.

Bharadwaj M, Nofchissey R, Goade D, Koster F & Hjelle B 2000. Humoral immune responses in the hantavirus cardiopulmonary syndrome. *J Infect Dis* 182: 43-48.

Bi Z, Formenty PB & Roth CE 2008. Hantavirus infection: a review and global update. *J Infect Dev Ctries* 2: 3–23.

- Bonecker ST, Portugal LG, Costa-Neto SF, Gentile R, 2009. A long term study of small mammal populations in a Brazilian agricultural landscape. *Mamm Biol* 74(6): 467–477.
- Bonvicino CR, Oliveira JA, D`Andrea PS. Guia dos Roedores do Brasil com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. 2008. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa-OPAS/OMS.
- Bonvicino CR, Lindberghi SM, Maroja LS 2002. Small non-flying mammals from conserved and altered áreas of Atlantic forest and Cerrado: comments on their potential use for monitoring environment. *Braz J Biol Nov* 62(4B):765-74.
- Braga CAC, Souza HCD, Pires MRS, Ribeiro SP 2009. Estudo da preferência de habitat e dieta de *Oligoryzomys nigripes* Olfers, 1918. *Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia*, São Lourenço, Minas Gerais.
- Brummer-Korvenkontio M, Vahari A, Von Bonsdorff CH, Vuorimies J, Manni T, Penttinen K et al 1980. Nephropathia epidêmica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis* 141: 131-134.
- Campos GM, Sousa RLM, Badra SJ, Pane C, Gomes UA, Figueiredo LTM 2003. Serological survey of hantavirus in Jardimópolis county, Brazil. *J Med Virol* 71: 417-422.
- Carey DE, Reuben R, Panicker KN, Shope RE & Myers RM 1971. Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. *Indian J Med Res* 59: 1758-1760.
- CDC 1993. Update: hantavirus pulmonary syndrome-United States, 1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 42: 816-820.
- Cherem JJ & Perez DM 1996. Mamíferos terrestres de floresta de araucária no município de Três Barras, Santa Catarina, Brasil. *Biotemas* 9:29-46.
- Childs JE, Ksiazek TG, Spiropoulou CF, Krebs JW, Morzunov S, Maupin GO, Gage KL, Rollin PE, Sarisky J, Enscoe RE & et al. 1994. Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as the primary rodent reservoir for a new hantavirus in the southwestern United States. *J Infect Dis* 169: 1271-1280.

Chu YK, Milligan B, Owen RD, Goodin DG & Jonsson CB 2006. Phylogenetic and geographical relationships of hantavirus strains in eastern and western Paraguay. *Am J Trop Med Hyg* 75: 1127-1134.

Chu YK, Owen RD, Gonzalez LM & Jonsson CB 2003. The complex ecology of hantavirus in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg* 69: 263-268.

Cruz CD, Forshey BM, Vallejo E, Agudo R, Vargas J, Blazes DL, Guevara C, Laguna-Torres VA, Halsey ES, Kochel TJ 2012. Novel strain of Andes virus associated with fatal human infection, central Bolivia. *Emerg Infect Dis* 18: 750-757.

Dalmagro AD, Vieira EM 2005. Patterns of habitat utilization of small rodents in an area of Araucaria forest in Southern Brazil. *Austral Ecology* 30: 353–362.

D’Andrea PS, Gentile R, Cerqueira R, Grelle CE V, Horta C, Rey L 1999. Ecology of small mammals in a Brazilian rural area. *Revista Brasileira de Zoologia* 16: 611–620.

D’Andrea PS, Gentile R, Maroja LS, Fernandes FA, Coura R, Cerqueira R 2007. Small mammal populations of an agroecosystem in the Atlantic Forest domain, southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 67: 179–186.

De Borba L, Delfraro A, Raboni SM & dos Santos CND 2013. First evidence of asymptomatic infection related to the Araucaria (Jquitiba-like) hantavirus. *BMJ case reports*.

Delfraro A, Clara M, Tome L, Achaval F, Levis S, Calderon G, Enria D, Lozano M, Russi J & Arbiza J 2003. Yellow pigmy rice rat (*Oligoryzomys flavescens*) and hantavirus pulmonary syndrome in Uruguay. *Emerg Infect Dis* 9: 846-852.

Edgar RC 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32: 1792–1797.

Elliott RM 1990. Molecular biology of the Bunyaviridae. *J Gen Virol* 71: 501-522.

Elliot RM, Bouloy M, Calisher CH, Goldbach R, Moyer JT, Nichol ST, Pettersson R, Plyusnin A & Schmaljohn CS 2000. Family Bunyaviridae. In MHV Van Regenmortel, CM Fauquet, DHL Bishop, EB Carsten, MK Estes, SM Lemon, J Maniloff, MA Mayo, DJ McGeoch, CR Pringle & RB Wickner, *Virus taxonomy. Seventh report of the*

International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier Academic Press, San Diego, p. 599-621.

Elliot RM, Schmaljohn CS & Collett MS 1991. Bunyaviridae: genome, structure and gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 169: 91–141.

Engelthaler DM, Mosley DG, Cheek JE, Levy CE, Komatsu KK, Ettestad P, Davis T, Tanda DT, Miller L, Frampton JW, Porter R & Bryan RT 1999. Climatic and environmental patterns associated with hantavirus pulmonary syndrome, Four Corners region, United States. *Emerg Infect Dis* 5: 87-94.

Enria DA 1998. Hantavirus emergence in the Americas and in Argentina. *Medicina (B Aires)* 58: 15-18.

Enria DA, Briggiler AM, Pini N, Levis S 2001. Clinical Manifestations of New World hantaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 256: 117-134.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U & Ball LA 2005. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. In CM Fauquet, MA Mayo, J Maniloff, U Desselberger & LA Ball, *Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, San Diego, p. 695-723.

Ferreira MS 2003. Hantaviruses. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 81-96.

Ferreira MS, Nishioka S, Santos TL, Santos RP, Santos PS & Rocha A 2000. Hantavirus pulmonary syndrome in Brazil: clinical aspects of three new cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42: 41-46.

Ferrer JF, Galligan D, Esteban E, Rey V, Murua A, Gutierrez S, Gonzalez L, Thakuri M, Feldman L, Poiesz B & Jonsson C 2003. Hantavirus infection in people inhabiting a highly endemic region of the Gran Chaco territory, Paraguay: association with *Trypanosoma cruzi* infection, epidemiological features and haematological characteristics. *Ann Trop Med Parasitol* 97: 269-280.

Figueiredo GG, Borges AA, Campos GM, Machado AM, Saggiaro FP, Sabino Junior Gdos S, Badra SJ, Ortiz AA & Figueiredo LT 2010. Diagnosis of hantavirus infection in humans and rodents in Ribeirao Preto, State of Sao Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 348-354.

Figueiredo LT, Campos GM, Rodrigues FB 2001. Hantavirus pulmonar and cardiovascular syndrome: epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis and treatment. *Rev Soc Bras Med Trop* 34(1): 13-23.

Figueiredo LT, Moreli ML, Campos GM, Sousa RL 2003. Hantaviruses in São Paulo State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 9: 891-892.

Figueiredo LTM, Moreli ML, Borges AA, de Figueiredo GG, Badra SJ, Bisordi I, Suzuki A, Capria S & Padula P 2009. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on Araraquara virus recombinant nucleocapsid protein. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 81: 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 2009. Hantavirus pulmonary syndrome, central plateau, southeastern, and southern Brazil. *Emerg Infect Dis* 15: 561-567.

Figueiredo LT, Souza WM, Ferrés M, Enria DA 2014. Hantavirus and cardiopulmonary syndrome in South America. *Virus Res*. doi: 10.1016/j.virusres.2014.01.015.

Firth C, Tokarz R, Simith DB, Nunes MRT, Bhat M, Rosa EST, Medeiros DBA, Palacios G, Vasconcelos PFC, Lipkin WI 2012. Diversity and distribution of hantaviruses in South America. *J Virol* 86: 13756-13766.

Frampton JW, Lanser S & Nichols CR 1995. Sin Nombre virus infection in 1959. *Lancet* 346: 781-782.

FUNDAÇÃO CIDE- Centro de Informações do estado do Rio de Janeiro. Mapa das Regiões de Governo do estado do Rio de Janeiro, segundo a divisão político-administrativa. 2007.

Gajdusek DC 1962. Virus hemorrhagic fevers. *J Pediatr* 60: 841-857.

Gavrilovskaya IN, Brown EJ, Ginsberg MH & Mackow ER 1999. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *J Virol* 73: 3951-3959.

Gavrilovskaya IN, Shepley M, Shaw R, Ginsberg MH & Mackow ER 1998. beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7074-7079.

Gentile R, D'Andrea PS, Cerqueira R, Maroja LS 2000. Population dynamics and reproduction of marsupials and rodents in a Brazilian rural area: a five-year study. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 9: 1-9.

Gimaque JBL, Bastos MDS, Braga WSM, Oliveira CMCD, Castilho MDC, Figueiredo RMPD & Mourão MPG 2012. Serological evidence of hantavirus infection in rural and urban regions in the state of Amazonas, Brazil. *Mem Inst Oswal Cruz* 107: 135-137.

Gouy M, Guindon S, Gascuel O 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution* 27: 221-224.

Graipel ME, Cherem JJ, Monteiro-Filho ELA, Glock L 2006. Dinâmica populacional de marsupiais e roedores no Parque Municipal da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. *Mastozoología Neotrop* 13(1): 31-49.

Gubler DJ, 2002. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 33: 330-342.

Gubler DJ, Reiter P, Eli KL, Yap W, Nasci R & Patz JA 2001. Climate variability and change in the United States: potencial impacts on vector- and rodent-borne diseases. *Environ Health Perspect* 109: 223-233.

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

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Husperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martinez E, Nathan MB, Pelegruno JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 8:S7-S16.

- GVE 2009. *Guia de vigilância epidemiológica*, Ministério da Saúde, Brasília, 816 pp.
- Hallin GW, Simpson SQ, Crowell RE 1996. Cardiopulmonary manifestations of the hantavirus pulmonary syndrome. *Critical Care Medicine* 24:252-258.
- Hart CA & Bennett M 1994. Hantavirus: no increasing problem? *Ann Trop Med Parasitol* 88: 347-358.
- Hart CA & Bennett M 1999. Hantavirus infections: epidemiology and pathogenesis. *Microbes Infect* 1: 1229-1237.
- Hepojoki J, Strandin T, Lankinen H, Vaheri A 2012. Hantavirus structure - molecular interactions behind the scene. *J Gen Virol* 93: 1631-1644.
- Hindrichsen S, Medeiros de Andrade A, Clement J, Leirs H, Mc Kenna P, Mattys P, Neild GH 1993. Hantavirus infection in Brazilian patients from Recife with suspected leptospirosis. *Lancet* 341: 8836-8850.
- Hjelle B, Jenison S, Torrez-Martinez N, Yamada T, Nolte K, Zumwalt R, MacInnes K & Myers G 1994b. A novel hantavirus associated with an outbreak of fatal respiratory disease in the southwestern United States: evolutionary relationships to known hantaviruses. *J Virol* 68: 592-596.
- Hjelle B & Torres-Perez F 2010. Hantaviruses in the americas and their role as emerging pathogens. *Viruses* 2: 2559-2586.
- Hjelle B, Lee SW, Song W, Torrez-Martinez N, Song JW, Yanagihara R, Gavrillovskaya I & Mackow ER 1995. Molecular linkage of hantavirus pulmonary syndrome to the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*: genetic characterization of the M genome of New York virus. *J Virol* 69: 8137-8141.
- Hjelle B, Torrez-Martinez N & Koster FT 1996. Hantavirus pulmonary syndrome-related virus from Bolivia. *Lancet* 347: 57.
- Huggins JW, Hsiang CM, Cosgriff TM, Guang MY, Smith JI, Wu ZO, LeDuc JW, Zheng ZM, Meegan JM, Wang QN & et al. 1991. Prospective, double-blind, concurrent,

placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* 164: 1119-1127.

Iversson LB, da Rosa AP, Rosa MD, Lomar AV, Sasaki Mda G & LeDuc JW 1994. Human infection by Hantavirus in southern and southeastern Brazil. *Rev Assoc Med Bras* 40: 85-92.

Iversson LB 1996. Doenças humanas por hantavírus. In: Veronesi R.C.; Focaccia R. (Ed.) Tratado de Infectologia, *Editora Atheneu*, São Paulo. p. 219-228.

Jenison S, Hjelle B, Simpson S, Hallin G, Feddersen R, Koster F 1995. Hantavirus pulmonary syndrome: clinical, diagnostic and virologic aspects. *Seminars Respiratory Infections* 10: 259-269.

Jin M, Park J, Lee S, Park B, Shin J, Song KJ, Ahn TI, Hwang SY, Ahn BY, Ahn K 2002. Hantaan virus enters cells by clathrin – dependent receptor – mediated endocytosis. *Virology* 294:60-69.

Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, Willians RJ, Bryan RT, Mills JN *et al* 1997. Laguna Negra virus associated with HPS in Western Paraguay and Bolivia. *Virology* 238: 115-127.

Johnson AM, de Souza LT, Ferreira IB, Pereira LE, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ & Nichol ST 1999. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. *J Med Virol* 59: 527-535.

Jonsson CB, Figueiredo LT & Vapalahti O 2010. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev* 23: 412-441.

Jonsson CB, Hooper J & Mertz G 2008. Treatment of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral research* 78: 162-169.

Jonsson CB & Schmaljohn CS 2001. Replication of hantaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 256: 15-32.

Jonsson KM 2001. Hantaviruses: history and overview. *Curr Top Microbiol Immunol* 256: 1-14.

Kang HJ, Arai S, Hope AG, Cook JA & Yanagihara R 2010. Novel hantavirus in the flat-skulled shrew (*Sorex roboratus*). *Vector Borne Zoonotic Dis* 10: 593-597.

Kang HJ, Bennett SN, Dizney L, Sumibcay L, Arai S, Ruedas LA, Song JW & Yanagihara R 2009a. Host switch during evolution of a genetically distinct hantavirus in the American shrew mole (*Neurotrichus gibbsii*). *Virology* 388: 8-14.

Kaukinen P, Koistinen V, Vapalahti O, Vaheri A, Plyusnin A 2001. Interaction between molecules of hantavirus nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 82: 1845-1853.

Ketai LH, Williamson MR, Telepak RJ, Levy H, Koster FT, Nolte KB & Allen SE 1994. Hantavirus-Pulmonary-Syndrome - Radiographic Findings in 16 Patients. *Radiology* 191: 665-668.

Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, Auste B, Aniskin V, Meisel H, Barriere P, Koivogui L, ter Meulen J & Kruger DH 2007. Novel hantavirus sequences in Shrew, Guinea. *Emerg Infect Dis* 13: 520-522.

Kruger DH, Ulrich R, Lundkvist A 2001. Hantavirus infections and their prevention. *Microbes and infection* 3:1129-1144.

Ksiazek TG, Peters CJ, Rollin PE, Zaki S, Nichol S, Spiropoulou C, Morzunov S, Feldmann H, Sanchez A, Khan AS, Mahy BWJ, Wachsmuth K & Butler JC 1995. Identification of a New North-American Hantavirus That Causes Acute Pulmonary-Insufficiency. *Am J Trop Med Hyg* 52: 117-123.

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

Lednicky JA 2003. Hantaviruses. a short review. *Arch Pathol Lab Med* 127: 30-35.

LeDuc JW, Smith GA & Johnson KM 1984. Hantaan-like viruses from domestic rats captured in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 33: 992-998.

LeDuc JW, Smith GA, Pinheiro FP, Vasconcelos PF, Rosa ES & Maiztegui JI 1985. Isolation of a Hantaan-related virus from Brazilian rats and serologic evidence of its widespread distribution in South America. *Am J Trop Med Hyg* 34: 810-815.

Lee HW, Baek LJ, Johnson KM 1982. Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 146: 638-644.

Lee HW, Lee PW, Baek LJ, Song CK, Seong IW 1981. Intraespecific transmission of Hantaan virus, etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, in the rodent *Apodemus agrarius*. *Am J Trop Med Hyg* 30: 1106-1112.

Lee HW, Lee PW & Johnson KM 1978. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 137: 298-308.

Lee PW, Amyx HL, Gajdusek DC, Yanagihara RT, Goldgaber D, Gibbs CJ Jr 1982. New hemorrhagic fever with renal syndrome-related virus in indigenous wild rodents in the United States. *Lancet* 2: 1405.

Lee PW, Amyx HL, Yanagihara R, Gajdusek DC, Goldgaber D & Gibbs CJ, Jr. 1985. Partial characterization of Prospect Hill virus isolated from meadow voles in the United States. *J Infect Dis* 152: 826-829.

Lee HW 1988. Global update on distribution of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantaviruses. *Virus Info Exch News* 5: 82-84.

Lee HW 1996. Epidemiology and pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrom. In *The Bunyaviridae*, pp. 253-267.

Lemos ERS, Alves-Correa AA, Oliveira RC, Rozental T, Pereira MM, Schatzmayr YR, Hermann G 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*. Soc Bras Virol 8:96-97.

Lemos ERS & Silva MV 2005. Hantavírus. In JR Coura, Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro, p. 1845-1853.

Lemos ERS & Silva MV 2013. Hantavírus. In JR Coura, Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro.

Levis S, Garcia J, Pini N, Calderon G, Ramirez J, Bravo D, St. Jeor S, Ripoll C, Bego M, Lozano E, Barquez R, Ksiazek TG, Enria D 2004. Hantavirus pulmonary syndrome in northwestern Argentina: circulation of Laguna Negra virus associated with *Calomys callosus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71:658–663.

Lima DM, Sabino-Santos Junior G, Oliveira ACA, Fontes RM, Colares JKB, Araújo FMDC & Pompeu MMDL 2011. Hantavirus infection in suspected dengue cases from State of Ceará, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 795-796.

Lopez N, Padula P, Rossi C, Miguel S, Edelstein A, Ramirez E & Franze-Fernandez MT 1997. Genetic characterization and phylogeny of Andes virus and variants from Argentina and Chile. *Virus Res* 50: 77-84.

Lundkvist A, Apekina N, Myasnikov Y, Vapalahti O, Vaheeri A & Plyusnin A 1997. Dobrava hantavirus outbreak in Russia. *Lancet* 350: 781-782.

MacNeil A, Ksiazek TG & Rollin PE 2011. Hantavirus pulmonary syndrome, United States, 1993-2009. *Emerg Infect Dis* 17: 1195-1201.

Martinez VP, Bellomo C, San Juan J, Pinna D, Forlenza R, Elder M & Padula PJ 2005. Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerg Infect Dis* 11: 1848-1853.

Mascarenhas-Batista AV, da Rosa ES, Ksiazek TG, da Rosa AP, Leduc JW, Pinheiro F, Tavares-Neto J 1998. Anti-hantavirus antibodies in school children in Salvador, Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 433-440.

Matheus S et al 2010. Hantavirus pulmonary syndrome, French Guiana. *Emerg Infect Dis* 16: 739-741.

McKee KT Jr, LeDuc JW, Peters JC 1991. Hantaviruses. In R Belshe (ed) *Textbook of Human Virology*, 2th ed., Mosby Year Book, Saint Louis, p. 615-632.

Meisel H, Lundkvist Å, Gantzer K, Bar W, Sibold C & Krüger DH 1998. First case of infection with hantavirus Dobrava in Germany. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17: 884-885.

Mendes WS, da Silva AA, Neiva RF, Costa NM, de Assis MS, Vidigal PM, da GL Leite M, da Rosa ES, de A Medeiros DB, de B Simith D, da C Vasconcelos PF 2010. Serologic survey of hantavirus infection, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 16: 889–891.

Mills JN 2006. Biodiversity loss and emerging infectious disease: An example from the rodent-borne hemorrhagic fevers. *Emerging Infectious Diseases* 7: 9–17.

Mills JN & Childs JE 1998. Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. *Emerg Infect Dis* 4: 529-537.

Mills JN, Ksiazek TG, Peters CJ, Childs JE 1999. Long-term studies of hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: a synthesis. *Emerging infectious diseases* 5: 135–142.

Mills JN, Schmidt K, Ellis BA, Calderon G, Enria DA & Ksiazek TG 2007. A longitudinal study of hantavirus infection in three sympatric reservoir species in agroecosystems on the Argentine Pampa. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7: 229-240.

Ministério da Saúde 2009. Brasil. Secretaria de vigilância em saúde. Hantavirose in: guia de vigilância epidemiológica. caderno 8, 2009. 7 edição. Brasília, DF: Ministério da Saúde.

Ministério da Saúde 2013. Casos confirmados de Hantavirose: Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1993 a 2013. Brasília/DF, Brasil. Disponível em [http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jun/21/ANEXO_HANTA\(2\).pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jun/21/ANEXO_HANTA(2).pdf)

Monroe MC, Morzunov SP, Johnson AM, Bowen MD, Artsob H, Yates T et al 1999. Genetic diversity and distribution of *Peromyscus*-borne hantaviruses in North America. *Emerg Infect Dis* 5: 75-86.

Morzunov SP, Rowe JE, Ksiazek TG, Peters CJ, St Jeor SC & Nichol ST 1998. Genetic analysis of the diversity and origin of hantaviruses in *Peromyscus leucopus* mice in North America. *J Virol* 72: 57-64.

Nichol ST 1999. Genetic analysis of hantaviruses and their hosts relationship. In JF Saluzzo, B Dodet (eds) *Emergence and control of rodent-borne viral diseases*. Elsevier Publishers, Paris French, p.99-109.

Nichol ST 2001. Bunyaviruses. In BN Fields, DM Knipe, & PM Howley, *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1603-1633.

Nichol ST, Beaty BJ, Elliot RM, Goldbach R, Plyusnin A, Schmaljohn CS & Tesh RB 2005. Family Bunyaviridae. In CM Fauquet, MA Mayo, J Maniloff, U Desselberger & LA Ball, *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, San Diego, p. 695-716.

Nichol ST, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ 1996. Hantavirus pulmonary syndrome and newly described hantaviruses in the United States. In RM Elliott (ed) *The Bunyaviridae*, Plenum Press, New York, p. 269-280.

Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki S & Peters CJ 1993. Genetic Identification of a Hantavirus Associated with an Outbreak of Acute Respiratory Illness. *Science* 262: 914-917.

Nogueira RM, Eppinghaus AL 2011. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswal Cruz* 106:255-256.

Nogueira RM, Miagostovich MP, Cavalcanti SM, Marzochi KB, Schatzmayr HG 1992. Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Virol* 143:423-7.

Nowak RM 1991. Walker's mammals of the world, 6th ed, *Johns Hopkins Univ. Press*, Baltimore, xxi+1921 pp.

Ogino M, Yoshimatsu K, Ebihara H & Arikawa J 1999. N-Acetylgalactosamine (GalNAc) – specific lectins mediate enhancement of Hantaan vírus infection. *Arch Virol* 144: 1765-1777.

Oliveira RC et al. 2007. Identification of *Akodon montensis* as reservoir host of a novel hantavirus in south Brazil. *VII International Conference on HFRS, HPS and Hantaviruses* - Buenos Aires/ARG - Abstract Book. p.126.

Oliveira RC, Guterres A, Fernandes J, D'Andrea PS, Bonvicino CR & Lemos ERS 2014. Hantavirus resevoirs: current status with an emphasis on data from Brazil. *Viruses* 6: 1929 – 1973.

Oliveira RC, Padula PJ, Gomes R, Martinez VP, Bellomo C, Bonvicino CR, Freire e Lima DI, Bragagnolo C, Caldas AC, D'Andrea PS, Lemos ER 2011. Genetic characterization of hantaviruses associated with sigmodontinae rodents in a endemic area for hantavirus pulmonary syndrome in southern Brazil. *Vector Borne Disease* 11:301-14.

Oliveira RC, Teixeira BR, Mello FC, Pereira AP, Duarte AS, Bonaldo MC, Bonvicino CR, D'Andrea PS & Lemos ER 2009. Genetic characterization of a Juquitiba-like viral lineage in *Oligoryzomys nigripes* in Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop* 112: 212-218.

Organização Panamericana de Saúde (OPAS) 1997. Ressurgimiento del dengue en las Americas. *Boletin Epidemiologico* 18:1-6.

Organização Panamericana de Saúde (OPAS) 2013. Alerta Epidemiológica: Dengue 21 de Junio 2013. Disponível em http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=3159&Itemid=1.

Padula PJ, Colavecchia SB, Martinez VP, Gonzalez Della Valle MO, Edelstein A, Miguel SD, Russi J, Riquelme JM, Colucci N, Almiron M & Rabinovich RD 2000. Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America. *J Clin Microbiol* 38: 3029-3035.

- Padula PJ, Edelstein A, Miguel SD, Lopez NM, Rossi CM & Rabinovich RD 1998. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* 241: 323-330.
- Padula P, Figueroa R, Navarrete M, Pizarro E, Cadiz R, Bellomo C, Jofre C, Zaror L, Rodriguez E & Murua R 2004. Transmission study of Andes hantavirus infection in wild sigmodontine rodents. *J Virol* 78: 11972-11979.
- Park K, Kim CS & Moon KT 2004. Protective effectiveness of hantavirus vaccine. *Emerg Infect Dis* 10: 2218-2220.
- Pereira GW, Teixeira AM, Souza MSD, Braga AD, Junior S, Figueiredo GGD, Figueiredo LTM, Borges AA 2012. Prevalence of serum antibodies to hantavirus in a rural population from the southern state of Santa Catarina, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 45: 117-119.
- Peters CJ 1998. Hantavirus pulmonary syndrome in the Americas. In WM Scheld, WA Craig & JM Hughes, *Emerging Infections*, ASM Press, Washington, p. 15-50.
- Peters CJ, Simpson GL & Levy H 1999. Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. *Annu Rev Med* 50: 531-545.
- Plyusnin A 2002. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. *Arch Virol* 147: 665-682.
- Plyusnin A, Horling J, Kanerva N, Mustonen L, Cheng Y, Partanen J et al 1997. Puumala hantavirus genome in patients with nephropatia epidemica: correlation of PCR positivity with HLA haplotype and link to virus sequences in local rodents. *J Clin microbiol* 35: 1090-1096.
- Plyusnin A, Vapalahti O & Vaheri A 1996. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol* 77: 2677-2687.
- Prebensen D 1997. Nephropatia epidemica infection during first trimester of pregnancy – normal fetal outcome. *Acta Obstet Gynecol Scand* 76: 884-5.

Puttker T, Pardini R, Meyer-Lucht Y, Sommer S 2008. Responses of five small mammal species to micro – scale variations in vegetation structure in secondary Atlantic forest remnants, Brazil. *Ecology* 8:9-19.

Raboni SM, de Borba L, Hoffmann FG, de Noronha L, Azevedo ML, Carstensen S, Mazarotto GA, Bordignon J & dos Santos CN 2009. Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of Brazil: case report. *J Clin Virol* 45: 153-156.

Ravkov EV, Nichol ST, Peters CJ & Compans RW 1998. Role of actin microfilaments in Black Creek Canal virus morphogenesis. *Journal of Virology* 72: 2865-2870.

Rodríguez JE 1993. Roedores plaga: un problema permanente en América Latina y el Caribe. *FAO, Oficina Regional para América Latina y el Caribe*. Santiago, Chile.

Romano-Lieber NS, Iversson LB, Fonseca BAL & Travassos da Rosa ES 1995. Infecção humana por hantavirus em área da estação ecológica de Jureia-Itatins, Vale do Ribeira, SP In: *Resumos do XXXI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, São Paulo, p.184.

Ronquist F, Huelsenbeck JP 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* (Oxford, England) 19: 1572–1574.

Rosa ES, Medeiros DB, Nunes MR, Simith DB, de Souza Pereira A, Elkhoury MR, Lavocat M, Marques AA, Via AV, D'Andrea P, Bonvicino CR, Lemos ER, Vasconcelos PF 2011. Pygmy rice rat as potential host of Castelo dos Sonhos hantavirus. *Emerg Infect Dis*. 17 (8) 1527-1530.

Rosa ES, Medeiros DBA, Nunes MRT, Simith DB, de S. Pereira A, Elkhoury MR, Santos ED, Lavocat M, Marques AA, Via AVG, Kohl VA, Terças ACP, D'Andrea P, Bonvicino CR, Lemos ERS, Vasconcelos PFC 2012. Molecular Epidemiology of Laguna Negra Virus, Mato Grosso State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 18: 982-985.

Rosa ES, Mills JN, Padula PJ, Elkhoury MR, Ksiazek TG, Mendes WS, Santos ED, Araujo GC, Martinez VP, Rosa JF, Edelstein A & Vasconcelos PF 2005. Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern

Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5: 11-19.

Santos IO, Figueiredo GGD, Figueiredo LTM, Azevedo MRAD, Novo NF & Vaz CAC 2013. Serologic survey of hantavirus in a rural population from the northern State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 46: 30-33.

Saggiaro FP, Rossi MA, Duarte MI, Martin CC, Alves VA, Moreli ML, Figueiredo LT, Moreira JE, Borges AA & 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: 1541-1549.

Schilling S, Ludolfs D, Van An L, Schimitz H 2004. Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. *J Clin Virol* 31:179-184.

Schmaljohn CS & Nichol ST 2007. Bunyaviridae. *Field's Virology* 2: 1741-1789.

Schmaljohn C & Hjelle B 1997. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg Infect Dis* 3: 95-104.

Schmaljohn CS & Hooper JW 2001. Bunyaviridae: the viruses and their replication. In BN Fields, DN Knipe, PM Howley, DE Griffin, MA Martin, RA Lamb, et al. (eds) *Field's Virology*, Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia, p. 1581-1602.

Schmaljohn CS & Patterson JL 1991. Bunyaviridae and their replication. In: BN Fields & DM Knipe, *Fundamental Virology*, Raven Press, New York, p. 545-566.

Schmaljohn CS, Hasty SE, Dalrymple JM, LeDuc JW, Lee HW, von Bonsdorff CH, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Tsai TF, Regnery HL & et al. 1985. Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. *Science* 227: 1041-1044.

Sheedy J, Froeb H, Batson H, Conley C, Murphy J, Hunter R, Cugell D, Giles R, Bershadsky S, Vester J & Yoe R 1954. The clinical course of epidemic hemorrhagic fever. *Am J Med* 16: 619-628.

Silva MSB, Souza GT, Moreli ML, Borges AA, Morais FA, Almeida AMP, Figueiredo LTM 2005. Looking for hantavirus infection in wild rodents captured in Rio de Janeiro State and in the Northeast of Brazil. *Virus Reviews & Research* vol. 10 suppl. 01.

Simpson SQ 1998. Hantavirus pulmonar syndrome. *Heart Lung* 27: 51-57.

Smadel J 1953. Epidemic hemorrhagic fevers. *Am J Public Health* 43: 1327-1330.

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.

Song G 1999. Epidemiological progresses of hemorrhagic fever with renal syndrome in China. *Chin Med J (Engl)* 112: 472-477.

Song JW, Gu SH, Bennett SN, Arai S, Puorger M, Hilbe M & Yanagihara R 2007a. Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*). *Virology* 4: 114.

Souza WMD, Machado AM, Figueiredo LTM & Boff E 2011. Serosurvey of hantavirus infection in humans in the border region between Brazil and Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 131-135.

Strauss JH, Strauss EG 2002. *Viruses and Human Disease*, Academic Press, San Diego, 365pp.

Sumibcay L, Kadjo B, Gu SH, Kang HJ, Lim BK, Cook JA, Song JW & Yanagihara R 2012. Divergent lineage of a novel hantavirus in the banana pipistrelle (*Neoromicia nanus*) in Cote d'Ivoire. *Virology* 9: 34.

Suzuki A, Bisordi I, Levis S, Garcia J, Pereira LE, Souza RP, Sugahara TK, Pini N, Enria D & Souza LT 2004. Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil. *Emerg Infect Dis* 10: 2127-2134.

SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). Dengue, Febre Amarela, Febre do Nilo Ocidental. Guia de Vigilância Epidemiológica. 8ª Ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28: 2731–2739.

Teixeira, BR, Loureiro-da-Cruz N, Strecht L, Gentile, R, Oliveira RC, Guterres A, Fernandes J, Mattos LHBV, Raboni SM, Rubio GBG, Bonvicino CR, Duarte-dos-Santos CN, Lemos ERS, D'andrea PS 2014. No Prelo. Population ecology of hantavirus rodent hosts in Southern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.

Terajima M, Hendershot JD, Kariwa H, Koster FT, Hjelle B, Goade D, DeFronzo MC & Ennis FA 1999. High levels of viremia in patients with the Hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis* 180: 2030-2034.

Terças ACP, dos Santos MA, Pignatti MG, Espinosa MM, de Melo Via AVG & Menegatti JA 2013. Hantavirus Pulmonary Syndrome Outbreak, Brazil, December 2009–January 2010. *Emerg infect dis* 19: 1824.

Travassos da Rosa ES, Mills JM, Padula PJ, Elkhoury MR, Ksiazek TG, Mendes WS, et al 2005. Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5: 11-19.

Toro J, Vega JD, Khan AS, Mills JN, Padula P, Terry W, Yadon Z, Valderrama R, Ellis BA, Pavletic C, Cerda R, Zaki S, Shieh WJ, Meyer R, Tapia M, Mansilla C, Baro M, Vergara JA, Concha M, Calderon G, Enria D, Peters CJ & Ksiazek TG 1998. An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Chile, 1997. *Emerg Infect Dis* 4: 687-694.

Umetsu F, Pardini R 2007. Small mammals in a mosaic of forest remnants and anthropogenic habitats – evaluating matrix quality in a Atlantic forest landscape. *Landscape Ecol* 22:517-530.

Vaheri A, Henttonen H, Voutilainen L, Mustonen J, Sironen T, Vapalahti O. 2013. Hantavirus infections in Europe and their impact on public health. *Rev. Med. Virol* 23: 35–49.

Vapalahti O, Kallio-Kokko H, Narvanen A, Julkunen I, Lundkvist A, Plyusnin A, Lehvaslaiho H, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A & Lankinen H 1995. Human B-cell epitopes of Puumala virus nucleocapsid protein, the major antigen in early serological response. *J Med Virol* 46, 293–303.

Vasconcelos MI, Lima VP, Iversson LB, Rosa MD, da Rosa AP, da Rosa ES, Pereira LE, Nassar E, Katz G, Matida LH, Zapparoli MA, Ferreira JJ & Peters CJ 1997. Hantavirus pulmonary syndrome in the rural area of Jucituba, São Paulo metropolitan area, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 39: 237-238.

Vaz VC, D`Andrea PS, Jansen AM 2007. Effects of habitat fragmentation on wild mammal infection by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*: 134: 1785-1793.

Vincent MJ, Quiroz E, Gracia F, Sanchez AJ, Ksiazek TG, Kitsutani PT, Ruedas LA, Tinnin DS, Caceres L, Garcia A, Rollin PE, Mills JN, Peters CJ & Nichol ST 2000. Hantavirus pulmonary syndrome in Panama: identification of novel hantaviruses and their likely reservoirs. *Virology* 277: 14-19.

Watson DC, Sargianou M, Papa A et al 2013. Epidemiology of hantavirus infections in humans: a comprehensive, global overview. *Crit Rev Microbiol* 40(3): 261-72.

Weiss S, Witkowski PT, Auste B, Nowak K, Weber N, Fahr J, Mombouli JV, Wolfe ND, Drexler JF, Drosten C, Klempa B, Leendertz FH & Kruger DH 2012. Hantavirus in bat, sierra leone. *Emerg Infect Dis* 18: 159-161.

Wells RM, Sosa ES, Yadon ZE, Enria D, Padula P, Pini N *et al* 1997. Na unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? *Emerg Infect Dis* 3: 171-174.

Guo WP, Lin XD, Wang W, Tian JH, Cong ML, et al. (2013) Phylogeny and Origins of Hantaviruses Harbored by Bats, Insectivores, and Rodents. *PloS Pathog* 9(2): e1003159. doi:10.1371/journal.ppat.1003159.

Yahnke CJ, Meserve PL, Ksiazek TG, Mills JN 2001. Patterns of infection with Laguna Negra virus in wild populations of *Calomys laucha* in the Central Paraguayan Chaco. *Am J Trop Med Hyg* 65: 768-776.

Yanagihara R, Amyx HL & Gajdusek DC 1985. Experimental infection with Puumala virus, the etiologic agent of nephropathia epidemica, in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *J Virol* 55: 34-38.

Yanagihara R, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr. & Traub R 1984. Prospect Hill virus: serologic evidence for infection in mammologists. *N Engl J Med* 310: 1325-1326.

Yates TL, Mills JN, Parmenter CA, Ksiazek TG, Parmenter RR, Vande Castler JRC, C. H., Nichol ST, Abbott KD, Young JC, Morrison ML, Beaty BJ, Dunnum JL, Baker RJ, Salazar-Bravo J & Peters CJ 2002. The ecology and evolutionary history of an emergent disease: Hantavirus pulmonary syndrome. *BioScience* 52: 989-998.

Zaki SR, Khan AS, Goodman RA, Armstrong LR, Greer PW, Coffield LM, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ & Khabbaz RF 1996. Retrospective diagnosis of hantavirus pulmonary syndrome, 1978-1993: implications for emerging infectious diseases. *Arch Pathol Lab Med* 120: 134-139.

Zeier M; Handermann M, Bahr U, Rensch B, Muller S, Kehn R, Muranyi W & Darai G 2005. New ecological aspects of hantavirus infection: a change paradigm and a challenge of prevention – a review. *Virus Genes* 30: 157-180.

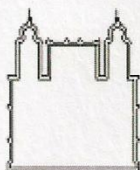
Zeller HG, Karabatsos N, Calisher CH, Digoutte JP, Cropp CB, Murphy FA & Shope RE 1989. Electron microscopic and antigenic studies of uncharacterized viruses. II. Evidence suggesting the placement of viruses in the family Bunyaviridae. *Arch Virol* 108:211-227.

10 - ANEXOS

10.1 – Registro de coleta de animais silvestres.

Nº LBCE : _____	TAG: _____	Espécie: _____
Sexo: Macho () Fêmea ()	Data de captura: ____/____/____	
PROCEDÊNCIA:		
Estado: _____	Município: _____	Localidade (fragmento): _____
Trilha: _____	Ponto: _____	Armadilha: _____
AMOSTRAS		
Coleta de sangue: sim (<input type="checkbox"/>) não (<input type="checkbox"/>)		
Hemocultivo: sim (<input type="checkbox"/>) nº de tubos ____ não (<input type="checkbox"/>)	Exame a fresco: sim (<input type="checkbox"/>) não (<input type="checkbox"/>)	
Soro: sim (<input type="checkbox"/>) não (<input type="checkbox"/>) Eppendorf (<input type="checkbox"/>)	Eluato (<input type="checkbox"/>)	Microhematócrito: _____
Cariótipo: sim (<input type="checkbox"/>) nº de tubos ____ não (<input type="checkbox"/>)	Responsável: _____	
Coleta para Hantavirus: rim (<input type="checkbox"/>) pulmão (<input type="checkbox"/>) fígado (<input type="checkbox"/>) baço (<input type="checkbox"/>) coração (<input type="checkbox"/>)		
Banco genético: Fígado (<input type="checkbox"/>) baço (<input type="checkbox"/>)	Ectoparasitas: sim (<input type="checkbox"/>) não (<input type="checkbox"/>)	
Endoparasitas: sim (<input type="checkbox"/>) não (<input type="checkbox"/>)	Responsável: _____	
Perfusão: sim (<input type="checkbox"/>) não (<input type="checkbox"/>)	Esfregaço: sim (<input type="checkbox"/>) não (<input type="checkbox"/>)	nº de lâminas: ____
CONDIÇÃO REPRODUTIVA / OUTRAS INFORMAÇÕES		
Vagina: aberta (<input type="checkbox"/>) fechada (<input type="checkbox"/>)		
Secreção: sim (<input type="checkbox"/>) não (<input type="checkbox"/>)	Tipo: _____	
Grávida: Sim (<input type="checkbox"/>) Não (<input type="checkbox"/>)	Lactante: Sim (<input type="checkbox"/>) Não (<input type="checkbox"/>)	
Útero: virgem (<input type="checkbox"/>)	não virgem: (<input type="checkbox"/>)	
Embriões/Filhotes nº: _____	Tamanho do embrião: _____	
Escrotado: (<input type="checkbox"/>)	Não escrotado: (<input type="checkbox"/>)	
Vesícula: sim (<input type="checkbox"/>) não (<input type="checkbox"/>)		
Cicatriz: Orelha: Sim (<input type="checkbox"/>) Não (<input type="checkbox"/>)	/ Cauda: Sim (<input type="checkbox"/>) Não (<input type="checkbox"/>)	
MARSUPIAIS		
Filhotes de marsupiais: nº _____	Hb _____	TA _____
Características: _____		
Manchas: sim (<input type="checkbox"/>)	não (<input type="checkbox"/>)	
Bolsa: virgem (<input type="checkbox"/>)	não virgem (<input type="checkbox"/>) Tetas: _____	
Dentição (sup./inf.): _____/_____		
MEDIDAS (em mm) / COLEÇÃO		
Peso: _____	Comp. Corpo _____	Cauda _____ Orelha: _____
Pé: c/ unha: _____	s/ unha: _____	
Pele: Taxidermizado (<input type="checkbox"/>)	Aberta (<input type="checkbox"/>)	em álcool (<input type="checkbox"/>)
Meio líquido: c/ pele (<input type="checkbox"/>)	s/ pele (<input type="checkbox"/>)	
OBSERVAÇÕES:		

10.2 – Parecer do comitê de ética para licença de captura de animais silvestres.



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" Avaliação da circulação de hantavirus entre roedores silvestres no estado do Rio de Janeiro e no estado do Paraná. "

número P-405/07, proposto por Paulo Sérgio D' Andrea, foi licenciado pelo N° L-049/08.

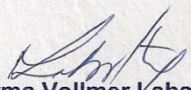
Sua licença de N° L-049/08 autoriza o uso anual de :

- 1540 *Didelphimorphia*

- 3350 *Rodentia*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 9 de junho de 2012.

Rio de Janeiro, 25/09/2008


Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ

10.3 – Licença permanente do IBAMA para coletas de mamíferos silvestres.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 13373-1		Data da Emissão: 19/11/2007 17:02
Dados do titular		
Registro no Ibama: 608054	Nome: PAULO SÉRGIO D ANDREA	CPF: 062.639.198-92
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas;
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Taxon(s)
1	ORDEM	Rodentia, Didelphimorphia
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Museu Nacional (UFRJ)	colecção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 91827146



Página 1/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 13373-1	Data da Emissão: 19/11/2007 17:02
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 608054	Nome: PAULO SÉRGIO D ANDREA	CPF: 062.639.198-92
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007. , a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta ser comunicada ao Ibama por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica, preferencialmente depositado em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.


Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 91827146



Página 2/2

Anexo 10.4 – Autorização de captura nº255/2006 CGFAU.


SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS
COORDENAÇÃO GERAL DE FAUNA
COORDENAÇÃO DE MANEJO DE FAUNA NA NATUREZA
Caixa Postal nº 09870, Brasília, DF, 70818-900 - Tel. (61) 316.1169 - Email: ugo.vercillo@ibama.gov.br

OFÍCIO Nº 297/06 - COFAN

Brasília, 06 de novembro de 2006.

A Sua Senhoria o Doutor
Paulo Sergio D'Andrea
Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Medicina Tropical
Laboratório de Biologia e Controle da Esquistossomose
Av. Brasil, 4365, Manguinhos
Rio de Janeiro, RJ
21040-900

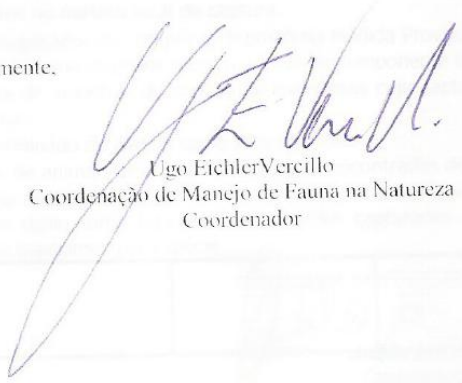
Assunto: Envio de autorização para captura, coleta e transporte de material zoológico.

Senhor Pesquisador,


1. Estamos enviando a autorização nº 225/2006 - CGFAU que permite a captura, coleta e transporte de material zoológico no âmbito do projeto "Estudos taxonômicos, evolutivos e comparativos sobre a ecologia e epidemiologia de mamíferos silvestres como reservatórios de parasitoses de importância médica e veterinária".

2. Deverá ser encaminhado a Coordenação Geral de Fauna, ao final da validade da autorização, relatório de atividades contendo o número de espécimes capturados, material biológico coletado, localidades e períodos da coleta do material biológico, e cópia do frontispício das publicações oriundas do objeto da autorização.

Atenciosamente,


Ugo Eichler Vercillo
Coordenação de Manejo de Fauna na Natureza
Coordenador

10.5 – Licença para pesquisa em unidade de Conservação.

 LICENÇA PARA PESQUISA EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	Unidade de Conservação: Parque Nacional da Serra dos Órgãos	Processo Nº: 02001.003618/03-06	Licença Nº: 084/2007	
		Pesquisador Estrangeiro Não	Validade: 16/04/2008	
Pesquisador Titular: Paulo Sérgio D'Andrea		Coleta: Sim		
Endereço: Rua Santa Clara, 335 Apt. 503 Bairro: Copacabana		Telefone: (212) 235-0457	Caixa Postal:	
		Cidade: Rio de Janeiro	CEP: 22041-010	UF: RJ
		Telefone: (212) 280-3740	Fax	Caixa Postal
Instituição de Pesquisa: Fundação Oswaldo Cruz, Endereço da Instituição: Av. Brasil 4365		Cidade: Rio de Janeiro	Cep: 21045-900	Estado RJ
Título do Projeto: Ecologia e conservação da biodiversidade em áreas agrícolas no domínio da Mata Atlântica/RJ -Biodiversidade e ecologia de populações de pequenos mamíferos.				
Datas de Permanência na Unidade: Deverão ser combinadas entre o chefe da unidade de conservação e o pesquisador.				
Observações: A renovação da licença ou encerramento do projeto ficará sujeita ao envio do relatório ao Chefe do Programa Gestão do Conhecimento e ao chefe da UC envolvida. O relatório deverá ser enviado em cópia impressa e digital. Esta licença não autoriza o acesso à informação genética e nem a remessa para instituição no exterior e ao conhecimento tradicional associado, ficando o titular da pesq. responsável pelo atendimento da medida prov. N.º 2.188-16, de 23 de agosto de 2001 e dec. N.º 3.945 de 28 de setembro de 2001, no que diz respeito aos acessos mencionados, em qualquer momento da referida pesquisa. Esta licença não autoriza coleta de espécies ameaçadas de extinção. Todo pesquisador estrangeiro deverá estar acompanhado de representante da instituição contraparte brasileira, durante as atividades de campo nas unidades de conservação contempladas na licença. - Haverá coleta de 10 exemplares por espécie/por expedição de roedores da família Cricetidae, sub-família sigmodontinae, para material testemunho e análise sorológicas e parasitológicas. -Participantes: Conforme Memorando nº 128 /2007/PROGR/DIREC/IBAMA. - OBS: Esta licença substitui a de nº 068/2007 que foi CANCELADA.				
Local e Data: Brasília, 16 de abril de 2007.		<i>Paula Barros</i> Maria Marques Guimarães Martin Analista Ambiental IBAMA		

10.6 – Ficha epidemiológica para casos suspeitos de dengue do LACEN.



GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE E DEFESA CIVIL
LABORATÓRIO CENTRAL NOEL NUTELS
Rua do Resende, 118 – CEP: 20.231-092 – CGC: 42.498.717/0011-27
Tel: 2332-8603 R:216/2332-8601

VERSÃO 4

Nº DA AMOSTRA

FICHA DE REQUISIÇÃO DE EXAME LABORATORIAL DE DENGUE

1. UNIDADE DE ATENDIMENTO DO PACIENTE: _____
TELEFONE DE CONTATO: (0XX - _____)

2. PACIENTE: 2.1 Número do Prontuário: _____
2.2 Nome do Paciente: _____
2.3 Nome da Mãe: _____
2.4 Endereço: Rua, Nº, complemento: _____
Bairro: _____ Município: _____ CEP: _____
2.5 Data de Nascimento: ____/____/____ 2.6 Sexo: F M

3. DADOS CLÍNICOS: 3.1 Data de início dos sintomas: ____/____/____
3.2 Manifestações clínicas:

<input type="checkbox"/> Febre	<input type="checkbox"/> Prostração	<input type="checkbox"/> Cefaléia	<input type="checkbox"/> Adenomegalia	<input type="checkbox"/> Mialgia
<input type="checkbox"/> Artralgia	<input type="checkbox"/> Dor retro orbitária	<input type="checkbox"/> Anorexia	<input type="checkbox"/> Náuseas	<input type="checkbox"/> Vômitos
<input type="checkbox"/> Diarréia	<input type="checkbox"/> Prurido	<input type="checkbox"/> Exantema	<input type="checkbox"/> Pejúquias	<input type="checkbox"/> Epistaxe
<input type="checkbox"/> Gengivorragia	<input type="checkbox"/> Hemorragia	<input type="checkbox"/> Choque	<input type="checkbox"/> Outras: _____	

3.3 Vacinado contra a Febre Amarela: NÃO SIM, em que data: ____/____/____
3.4 Esteve em área de Febre Amarela: NÃO SIM, em que data: ____/____/____
3.5 Já teve Dengue antes? NÃO SABE NÃO SIM, em que data: ____/____/____

3. EXAME(S) SOLICITADO(S):
 SOROLOGIA ISOLAMENTO PCR NS1
 Após o 5º dia e/ou Casos graves/gestantes/óbito Até o 5º dia Até o 5º dia e /ou Casos graves/gestantes/óbito Até o 8º dia e/ou Casos graves/gestantes/óbito ou Projeto Sentinela (ver protocolo)

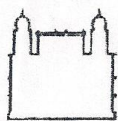
4. MÉDICO REQUERENTE:
 Nome/Carimbo/C.R.M.: _____ Assinatura: _____ Data da Requisição: ____/____/____

5. COLETA:
 5.1 Data da coleta: ____/____/____ 1ª Coleta: 2ª Coleta

Form. ANEXO II, R.7 Dengue 16/05/2001

Campos em cinza = Preenchimento Obrigatório

Anexo 10.7 – Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FIOCRUZ.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 28 de abril de 2011.

Carta: 012/11

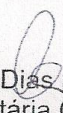
De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos e
- Dr. Christian Gabriel Niel

Prezados Senhores,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **559/10** intitulado “**Projeto de Pesquisa Associado às atividades de referência do laboratório de Hantavirose e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ**” com a deliberação de **APROVADO**.

Atenciosamente


Carla Dias Netto
Secretária Geral
CEP/Fiocruz

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705
Manguinhos - RJ. - CEP.: 21.040-360
Tels.: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815
e-mail: etica@fiocruz.br

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

P436 Pereira, Liana Strecht

Avaliação da infecção por hantavírus em amostras humanas e de roedores silvestres e sinantrópicos no estado do Rio de Janeiro / Liana Strecht Pereira. – Rio de Janeiro, 2014.
xvi, 90 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical,
2014.

Bibliografia: f. 62-82

1. Hantavírus. 2. Rio de Janeiro. 3. Síndrome pulmonar por hantavírus. 4. Roedores. I.
Título.

CDD 616.918