

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)

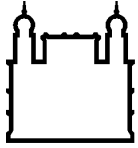
Mestrado em Medicina Tropical

Pesquisa de *Arenavirus* em humanos e roedores silvestres no Mato Grosso do Sul e em profissionais que manuseiam animais no Brasil

Jorlan Fernandes de Jesus

RIO DE JANEIRO

Janeiro de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)

Mestrado em Medicina Tropical

Pesquisa de *Arenavirus* em humanos e roedores silvestres no Mato Grosso do Sul e em profissionais que manuseiam animais no Brasil

Jorlan Fernandes de Jesus

Tese apresentada ao 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.

ORIENTADOR: Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos

RIO DE JANEIRO

Janeiro de 2014

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

J58 Jesus, Jorlan Fernandes de

Pesquisa de Arenavirus em humanos e roedores silvestres no Mato Grosso do Sul e em profissionais que manuseiam animais no Brasil / Jorlan Fernandes de Jesus. – Rio de Janeiro, 2014.

xvii, 124 f. : il. ; 30 cm.

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

Bibliografia: f. 96-117

1. Arenavirus. 2. **Roedores**. 3. **Mato Grosso do Sul**. 4. Profissionais de saúde. 5. Animais silvestres. I. Título.

CDD 579.256

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)

Mestrado em Medicina Tropical

Pesquisa de *Arenavirus* em humanos e roedores silvestres no Mato Grosso do Sul e em profissionais que manuseiam animais no Brasil

Jorlan Fernandes de Jesus

ORIENTADOR: Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos

Aprovado em: / /

EXAMINADORES:

Dr. Edson Elias da Silva (Presidente) – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Dra. Rosana Gentile – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Dr. Márcio Neves Bóia – (Suplente e Revisor) – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

RIO DE JANEIRO

Janeiro de 2014

À todos que acreditaram e sonharam junto comigo.

*“The important thing is not to stop questioning,
curiosity has its own reason for existing”*

Albet Einstein

AGRADECIMENTOS

À minha família que me apoiou e me deu forças para que esse sonho pudesse se tornar realidade. Em especial, à minha mãe Maria Aparecida, que com todo seu amor, sempre me apoiou e incentivou aguentando firme a distância e as saudades, exemplo de compaixão e amor ao próximo, e ao meu pai, Ezio, pelo suporte e auxílio nesses anos.

À minha orientadora Dr^a Elba Lemos, que com seu carinho e conhecimento únicos me guiou por toda essa jornada, me auxiliando sempre que foi preciso. Sua força de vontade, dedicação e amor pelo que faz são um exemplo a ser seguido. Obrigado por acreditar em mim.

À Renata Carvalho e Alexandro Guterres, meus amigos e irmãos mais velhos, difícil falar de vocês separadamente. Agradeço a dedicação, carinho e tempo investido não só para execução deste trabalho, mas também como executores colaboradores do mesmo. Foram incontáveis conselhos, ajudas e enxugar de lágrimas. Esse trabalho é fruto da nossa paixão pelo o que fazemos com companheirismo sem igual. Aprendo mais a cada dia compartilhando com vocês. Esse trabalho também é de vocês. Obrigado por TUDO.

À minha namorada Natália Maria Lanzarini, que nesses dois anos foi amiga, companheira sincera e incondicional e meu porto seguro. Foi impossível não me apaixonar por você. Obrigado por estar ao meu lado em todos os momentos e por me fazer tão feliz.

À Namir Moreira que me apresentou ao mundo da ciência.

Aos membros do LHR, a cada um de vocês muito obrigado por todos esses quatro anos trabalhando juntos.

Às amigas e parceiras de laboratório e mestrado Liana Strecht e Kerla Monteiro, estamos juntos desde o início, sei da importância dessa jornada para cada uma de vocês, obrigado por dividirem isso comigo.

Às amigas de mestrado Helena Medina, Lyana Lima e Thais Souza, muito mais do que conhecimento levo desses dois anos grandes amizades que cultivarei pela vida inteira. Cada risada, conselho, frases e histórias que ficarão marcados para sempre. Essa jornada não seria a mesma sem vocês. Obrigado pela amizade.

À Tatiana Rozental e Bernardo Teixeira, pelas risadas, almoços e discussões sobre os mais diversos aspectos desse trabalho.

À Dra Silvana Levis do *Instituto Nacional de Doenças Virais Humanas Dr. Júlio I. Maiztegui*, Pergaminho, Argentina, por ceder os atígenos utilizados neste trabalho.

À Luciana Bassan (e a pequena Clarinha), por me auxiliarem com as fichas dos pacientes e Raphael Gomes pelo auxílio com a sorologia.

À Maria Angélica, por dividir seu conhecimento de design e pelo tempo investido no layout das minhas apresentações.

Ao Dr Márcio Neves Bóia pelo apoio desde o início dessa caminhada.

À Dra Luzia Pinto e todos do Laboratório de Imunologia Viral do IOC por cederem as amostras para realização desse trabalho.

À Dra Rosany Bochner pelo auxílio com as análises estatísticas.

Ao Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, em especial, à Dra Cibele e ao Paulo D'Andrea pelo auxílio na captura e taxonomia dos animais desse estudo.

Ao Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo por permitir o uso das suas instalações e equipamentos.

Aos amigos Camila Faria, Juliana Wilhelmi e Luis Eduardo Gomes amigos de todas as horas.

Aos meus colegas de turma do Mestrado, pelos momentos que compartilhamos e à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical e aos demais membros do corpo docente por todo conhecimento que nos foi passado.

À Sociedade Brasileira de Mastozoologia por permitir o recrutamento dos participantes durante a realização do VI Congresso Brasileiro de Mastozoologia.

Ao CNPq pelo apoio financeiro na realização do projeto.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1- INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações Gerais.....	1
1.2. Aspectos Viroológicos.....	4
1.2.1. Morfologia e Organização Genômica	4
1.2.2. Classificação Taxonômica	5
1.2.3. Replicação	7
1.2.4. Relações Genéticas e Antigênicas.....	9
1.3. Febres Hemorrágicas Americanas	12
1.3.1. Patogenia e Resposta Imunológica.	12
1.3.2. Febre Hemorrágica Argentina.....	15
1.3.3. Febre Hemorrágica Boliviana	23
1.3.4. Febre Hemorrágica Venezuelana	31
1.3.5. Febre Hemorrágica Brasileira	36
1.3.6. Febre Hemorrágica na Bolívia – Vírus Chapare	39
1.4. Arenavírose e o Risco Ocupacional	40
2- JUSTIFICATIVA.....	42
3- OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo Geral.....	44
3.2. Objetivos Específicos	44
4- MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1. Desenho de estudo	47
4.2. Amostras Humanas	47
4.2.1. Profissionais de saúde que manuseiam animais.....	46
4.2.1.1. Coleta de material biológico dos profissionais de saúde	47
4.2.1.2. Teste sorológico	47
4.2.2. Amostras de pacientes com suspeita de dengue do estado do Mato Grosso do Sul	48
4.2.2.1. Análise Molecular	48

4.2.2.2. Teste sorológico	50
4.3. Amostras de roedores silvestres.....	50
4.3.1. Área de coleta.....	50
4.3.1.1. Município de Sidrolândia.....	51
4.3.1.2. Município de Dois Irmãos do Buriti	53
4.3.1.3. Município de Cassilândia.....	54
4.3.3. Captura de roedores silvestres.....	56
4.3.3.1. Identificação dos roedores.....	57
4.3.4. Identificação da infecção por <i>Arenavirus</i> nos roedores do MS.....	57
4.3.4.1. Extração RNA viral de amostras de tecidos	57
4.3.4.2. Extração RNA viral de amostras de soro.....	59
4.3.4.3. Transcrição reversa do RNA (RT) seguida de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	59
4.3.4.4. Análise de DNA em gel de agarose	60
4.4. Seleção e desenho de oligonucleotídeos	60
4.5. Purificação e sequenciamento de nucleotídico	62
4.6. Análise filogenética	63
4.7. Análise estatística	63
4.8. Considerações éticas	63
5- RESULTADOS	65
5.1. Identificação da infecção por <i>Arenavirus</i> em profissionais que manuseiam animais	65
5.1.1. Perfil da População	65
5.1.1. Inquérito Sorológico.....	67
5.2. Identificação da infecção por <i>Arenavirus</i> em pacientes com suspeita de dengue do Mato Grosso do Sul	68
5.2.1. Perfil da População	68
5.2.2. Testes Moleculares e Sorológicos.....	69
5.3. Identificação da infecção por <i>Arenavirus</i> em roedores silvestres do Mato Grosso do Sul.....	69
5.3.1. Animais capturados.....	69
5.3.2. Pesquisa do genoma viral.....	71
5.3.3. Sequenciamento completo do segmento S dos <i>Arenavirus</i>	74
5.3.4. Análise filogenética.....	75
5.3.4.1. Análise Filogenética da proteína GPC (Parcial).....	75

5.3.4.2. Análise Filogenética da proteína NP (Parcial)	75
5.3.4.3. Análise Filogenética das proteínas GPC e NP Completas.....	75
5.3.4.4. Análise Filogenética da proteína NP dos <i>Arenavirus</i> da Clade C do Novo Mundo	76
6- DISCUSSÃO.....	82
6.1. Identificação da infecção por <i>Arenavirus</i> em profissionais que manuseiam animais	82
6.2. Identificação da infecção por <i>Arenavirus</i> em casos suspeitos de dengue do Mato Grosso do Sul.....	86
6.3. Identificação da infecção por <i>Arenavirus</i> em roedores silvestres do estado do Mato Grosso do Sul	88
7- CONCLUSÕES.....	94
8- PERSPECTIVAS	95
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
10- ANEXOS.....	118
Anexo 10.1: Quadro suplementar 1.1	118
Anexo 10.2: Questionário epidemiológico profissionais de saúde que manuseiam animais	121
Anexo 10.3: TCLE.....	123
Anexo 10.4: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/FIOCRUZ.....	124

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Pág.
Figura 1.1: Distribuição mundial dos arenavírus.....	2
Figura 1.2: Morfologia e estrutura do gênero <i>Arenavirus</i>	5
Figura 1.3: Esquema do ciclo de replicação dos arenavírus do Novo Mundo	6
Figura 1.4: Esquema representativo da estratégia <i>ambisense</i> dos <i>Arenavirus</i>	9
Figura 1.5: Ilustração das relações filogenéticas entre a nucleoproteína das 25 espécies de arenavírus reconhecidas	10
Figura 1.6: Extensão progressiva da febre hemorrágica argentina.....	17
Figura 1.7: Febre hemorrágica argentina.....	19
Figura 1.8: Mapa da Bolívia.....	27
Figura 1.9: Roedor reservatório do vírus Guanarito: <i>Zygodondomys brevicauda</i>	32
Figura 1.10: Mapa da Venezuela destacando as áreas de risco para infecção pelo vírus Guanarito.....	34
Figura 4.1: Estado do Mato Grosso do Sul, destacando os três municípios onde ocorreram as capturas dos roedores silvestres	51
Figura 4.2: Usina hidroelétrica PHC Planalto situada no município de Cassilândia ainda em construção.....	55
Figura 4.3: Estratégia para amplificação e sequenciamento direto dos arenavírus incluídos no estudo	61
Figura 5.1: Local de captura de animais silvestres, por UF e região geográfica.....	67
Figura 5.2: Porcentagem de gêneros de animais silvestres capturados nos municípios de Sidrolândia, Dois Irmãos do Buriti e Cassilândia.....	70

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELAS	Pág.
Tabela 4.1: Regiões de amostragem de pequenos mamíferos no município de Sidrolândia.....	52
Tabela 4.2: Regiões de amostragem de pequenos mamíferos no município de Dois Irmãos do Buriti.....	53
Tabela 4.3: Regiões de amostragem de pequenos mamíferos no município de Cassilândia.....	55
Tabela 5.1: Idade e sexo dos profissionais que manuseiam animais incluídos no estudo de prevalência de anticorpos-anti arenavírus	65
Tabela 5.2: Regiões de amostragem de pequenos mamíferos no município de Informações sobre as atividades associadas com captura e processamento de animais dos profissionais que manuseiam animais incluídos no estudo de prevalência de anticorpos-anti arenavírus	66
Tabela 5.3: Relação entre sexo e frequência de utilização de EPIs entre os profissionais que manuseiam animais participantes do estudo sobre prevalência de anticorpos anti-arenavírus	66
Tabela 5.4: Dados demográficos e manifestações clínicas dos pacientes suspeitos de dengue confirmados e não confirmados (2007 e 2010), MS.	68
Tabela 5.5: Descrição do número total de animais coletados no estudo sobre arenavírus nos municípios de Sidrolândia, Dois Irmãos do Buriti e Cassilândia -MS.....	69
Tabela 5.6: Descrição dos animais analisados por município no estudo sobre arenavírus nos municípios de Sidrolândia, Dois Irmãos do Buriti e Cassilândia.....	70
Quadro 5.1: Resumo dos resultados obtidos na análise molecular e sequenciamento dos roedores dos municípios de Sidrolândia e Dois Irmãos do Buriti-MS	72
Quadro 5.2: Resumo dos resultados obtidos na análise molecular e sequenciamento dos roedores do município Cassilândia.....	73
Tabela 5.7: Prevalência molecular da infecção por arenavírus em roedores silvestres capturados no estado do Mato Grosso do Sul	74

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

%	Percentual
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
CDC	<i>Center for Diseases Control</i> (Centro de Controle de Doenças)
cm ³	Centímetro cúbico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
EPI	Equipamento de proteção individual
EUA	Estados Unidos da América
G1	Glicoproteína 1
G2	Glicoproteína 2
HLA	Human Leucocyte Antigens
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
Kb	Kilobases
kDa	Kilodáltons
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS	Ministerio da Saúde
NP	Nucleoproteína
NB	Nível de segurança biológica
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial de hidrogênio
PRNT	Neutralização por redução de placa
RdRp	RNA polimerase RNA dependente

RNPs	Ribonucleocapsídeos
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
A	Alfa
β	Beta
γ	Gama

RESUMO

Os arenavírus são membros da família *Arenaviridae* que é constituída de um gênero único (*Arenavirus*), que atualmente compreende 25 espécies. Os reservatórios naturais dessa família são em sua maioria roedores. A exposição humana aos arenavírus ocorre, principalmente, através da inalação de aerossóis contendo partículas virais procedentes de urina, fezes ou saliva de roedores silvestres infectados. Arenavírus são responsáveis por causar graves doenças em humanos: febre hemorrágica (FH) e/ou meningite, com altas taxas de letalidade. No Brasil, após a identificação do primeiro e único caso de febre hemorrágica Brasileira (FHB), em 1990, nenhum estudo até o momento conseguiu identificar o possível reservatório do vírus Sabiá. Em nosso país cinco espécies de arenavirus já foram descritas nos últimos anos em diferentes biomas e regiões. Além disso, o Brasil faz fronteira com três países onde FH causadas por arenavírus são endêmicas (Argentina, Bolívia e Venezuela), tornando factível a introdução de arenavírus exóticos em nosso território. O presente estudo foi desenvolvido com amostras humanas e de roedores silvestres no estado de Mato Grosso do Sul. O estudo com amostras humanas foi constituído por dois distintos grupos: (i) amostras de profissionais de saúde, de diversas regiões do Brasil, que exercem atividades nas quais existe o contato com animais silvestres, com o objetivo de inferir as regiões do país onde esses vírus possam estar circulando; (ii) amostras de soro de casos suspeitos e confirmados de dengue provenientes do Mato Grosso do Sul. No inquérito sorológico nos profissionais que manuseiam animais foi encontrada uma prevalência de 0.7% pela técnica ELISA, confirmando o baixo risco de transmissão de arenavírus nesta população com elevada exposição. Não foi detectada a infecção ou contato prévio com arenavírus nas amostras de pacientes com suspeita de dengue, com ou sem confirmação laboratorial, procedentes do estado do Mato Grosso do Sul, porém foram detectadas altas prevalências (21.6%), por RT-PCR, de infecção por arenavírus nos roedores das espécies *Calomys callosus* e *Necromys lasiurus* no estado confirmando a hipótese de circulação de arenavírus em áreas onde os roedores reservatórios se encontram distribuídos e apontam para a importância da vigilância epidemiológica para os arenavírus considerados patogênicos para o homem. Por fim, o sequenciamento de nucleotídeo do segmento S completo possibilitou a identificação de dois vírus, sem descrição prévia no Brasil, os vírus Latino em *C. callosus* e Oliveros em *N. lasiurus*.

ABSTRACT

The arenaviruses are members of Arenaviridae family that consists of a single genus (*Arenavirus*), which currently comprises 25 species. The natural reservoirs of this family are mostly wild rodents. Human exposure to arenaviruses occurs mainly through inhalation of aerosols containing virus particles coming from urine, feces or saliva of infected rodents. Arenaviruses are responsible for causing serious diseases in humans: hemorrhagic fever (HF) and/or meningitis, with high mortality rates. In Brazil, after the identification of the first and only case of Brazilian hemorrhagic fever (FHB) in 1990, no study to date has identified the possible reservoir of Sabiá virus. In our country there are five *Arenavirus* species habitting different biomes and regions. In addition, Brazil is bordered by three countries where the FH are endemic (Argentina, Bolivia, and Venezuela), making feasible the introduction of exotic arenavirus in our territory. This study was conducted with human and wild rodents' specimens in the state of Mato Grosso do Sul. The study of human samples consisted of two distinct groups: (i) samples of health professionals, from many regions of Brazil, performing activities where there is direct contact with wild animals, with the goal of inferring regions of the country where these viruses may be circulating; (ii) serum samples of suspected or confirmed cases of dengue fever from the Mato Grosso do Sul. In the serological survey on animal handlers a prevalence of 0.7 % was found using ELISA, confirming the low risk of arenaviruses transmission in this population with high exposure. We did not detect infection or previous contact with arenaviruses in samples from patients with suspicion of dengue fever, with or without laboratory confirmation coming from the state of Mato Grosso do Sul, however we detected high prevalence (21.6%) of arenaviruses infection in *Calomys callosus* and *Necromys lasiurus* rodents in the same state, using RT-PCR, confirming the hypothesis that these viruses circulation in areas where rodent reservoirs are distributed and point to the importance of surveillance of arenavirus considering it's ability to be pathogenic to man. Finally, the nucleotide sequencing of the complete S segment allowed the identification of two viruses without previous description in Brazil, the Latin virus in *C. callosus* and Oliveros virus in *N.lasiurus*.

1- INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

O termo **febres hemorrágicas virais** (FHV) se refere a um grupo de doenças causadas por diferentes famílias virais (Arenaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae e Flaviviridae) que se apresentam como síndromes febris agudas caracterizadas pelo envolvimento sistêmico, e hemorragia generalizada em casos graves (Ippolito et al. 2012). Essas famílias virais têm como características em comum: (i) são vírus envelopados de RNA fita simples, (ii) são vírus que são mantidos na natureza em hospedeiro vertebrado ou invertebrado, chamados de reservatórios naturais, que limitam, muitas vezes, esses vírus às áreas onde as espécies hospedeiras vivem; (iii) são vírus que, acidentalmente, infectam o homem a partir do contato com hospedeiros infectados (Vainrub & Salas 1994a).

Embora o homem não seja o reservatório natural para qualquer vírus causador de febre hemorrágica, algumas espécies, no entanto, após a transmissão acidental hospedeiro-homem, podem ser transmitidos pessoa-pessoa, com consequente disseminação hospitalar e acometimento tanto de profissionais de saúde quanto de pacientes. Esta disseminação pessoa-pessoa, que frequentemente está associada com elevada morbidade e letalidade, tem gerado um enorme interesse pela mídia mundial com grande notoriedade pública na última década. Com algumas exceções, não há cura ou tratamento medicamentoso estabelecido para as FHV (Vainrub & Salas 1994a, Timothy et al. 1998, Jahrling et al. 2004)

As FHV possuem distribuição mundial. Nas Américas, em especial na América do Sul, existe um grande número de casos anuais de FHV, causadas pelos vírus dengue, o vírus da febre amarela, os hantavírus e os arenavírus (Brandling-Bennett & Pinheiro 1996, Tesh 2002, Figueiredo 2006).

Os arenavírus são responsáveis por doenças de elevada letalidade, caracterizadas por febres hemorrágicas e/ou meningites em humanos. São conhecidas pelo menos 10 espécies capazes de causar doença em humanos, mundialmente distribuídas, a maioria delas identificadas na América do Sul (J Casals 1975, Briese et al. 2009) (Figura 1.1.).

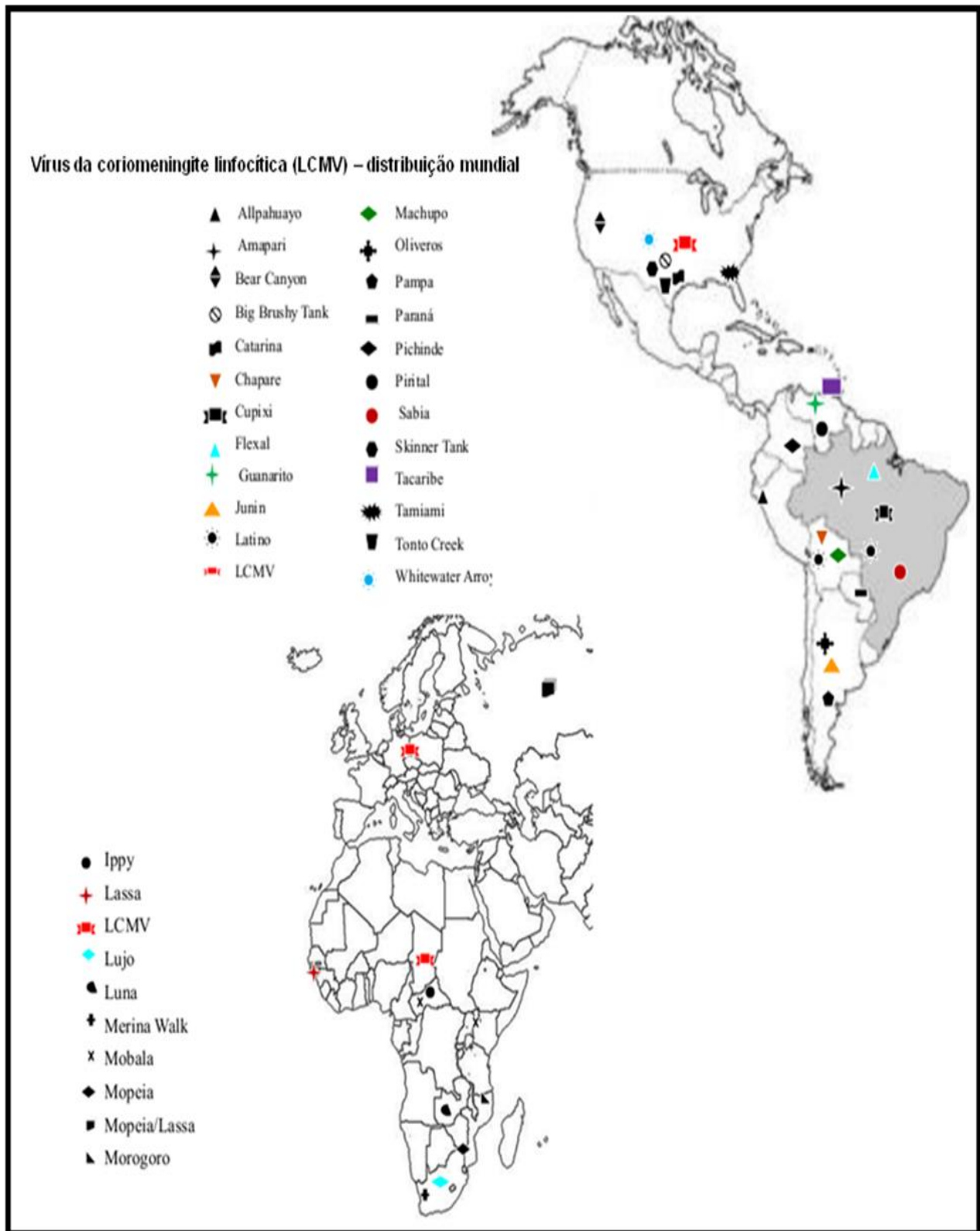


Figura 1.1. Distribuição mundial dos arenavírus (os símbolos coloridos representam os arenavírus patogênicos).

A coriomeningite linfocítica (LCM) é uma doença febril muitas vezes sem sinais neurológicos, que pode evoluir para uma meningite asséptica. Sua distribuição mundial se deve à associação entre o agente etiológico (vírus da LCM - LCMV) e o roedor cosmopolita *Mus musculus*. A doença ocorre em forma de pequenos surtos esporádicos, geralmente acometendo crianças e adultos jovens, como ocorreram nos surtos registrados nos EUA e na Alemanha, onde as fontes de infecção foram roedores revendidos como animais de estimação (Fischer et al. 2006, Amman et al. 2007, Palacios et al. 2008).

A febre do Lassa, outra doença causada por arenavírus, ocorre de forma endêmica em países da África Ocidental, mas que tem geograficamente se expandindo no continente africano. Estima-se que ocorram aproximadamente 100.000 infecções pelo vírus Lassa (LASV) todos os anos na África, com cerca de 5.000 óbitos (Bowen et al. 2000). Em surtos hospitalares a letalidade pode atingir taxas de 50%, considerando a capacidade do vírus Lassa de ser transmitido de pessoa-pessoa e que mais de uma vez este vírus já causou surtos em hospitais na África, atingindo médicos e enfermeiras que cuidaram dos pacientes infectados (Monath et al. 1973). Casos importados de febre do Lassa já foram notificados nos EUA, Inglaterra, Japão e Alemanha, fato que reforça a importância do conhecimento da doença por clínicos fora do continente africano (Günther et al. 2000, Macher & Wolfe 2006).

Mais recentemente, o vírus Lujo, isolado de casos humanos de febre hemorrágica na África, foi reconhecido como um novo membro da família *Arenaviridae* e também demonstrou potencial de transmissão pessoa-pessoa (Briese et al. 2009).

As febres hemorrágicas americanas causadas por arenavírus (FHA) são zoonoses com altas taxas de letalidade (15-30%) e com grande impacto na saúde pública (Ambrosio et al. 2011). Essas doenças vêm sendo identificadas na América do Sul desde 1959 e são caracterizadas como doenças sistêmicas graves com alterações na permeabilidade vascular e na vasoregulação, com manifestações neurológicas e trombocitopenia (de Manzione et al. 1998). Até o momento, cinco espécies de arenavírus patogênicas já foram descritas na América do Sul: o vírus Junín na Argentina, os vírus Machupo e Chapare na Bolívia, o vírus Guanarito na Venezuela e o vírus Sabiá no Brasil (Arribalzaga 1955, Mackenzie et al. 1964b, Salas et al. 1991, Coimbra et al. 1994, Delgado et al. 2008). Existe, também, investigação de casos de FHA causada pelo vírus Ocozocoautla de Espinosa no México e pelo vírus Whitewater Arroyo nos EUA (Fulhorst et al. 1996, Cajimat et al. 2012).

1.2. Aspectos Viroológicos

1.2.1. Morfologia e Organização Genômica

Os arenavírus são vírus esféricos ou pleomórficos, com um diâmetro que varia de 110 - 130 nm e que possuem um genoma de RNA fita simples de polaridade negativa, bi-segmentado. Os segmentos possuem aproximadamente 3.5kb e 7kb, com o menor e o maior segmento denominados, respectivamente, S (*small*) e L (*large*), que se encontram envolvidos por uma bicamada lipídica derivada da membrana das células hospedeiras. O segmento S codifica para nucleoproteína (NP) e para o precursor de glicoproteínas (GPC) clivado secundariamente nas proteínas do envelope GP1 e GP2 e o peptídeo de sinal estável (SSP). A RNA polimerase RNA dependente (RpRd ou proteína L) e a proteína de matriz ligada ao zinco (proteína Z) são codificadas pelo segmento L dos arenavírus (Meyer & Southern 1994, López et al. 2000).

Projeções de 8 a 10nm de comprimento, compostas pelas duas glicoproteínas virais, GP1 (40-64 kDa) e GP 2 (35-44 kDa) se encontram incorporadas à bicamada lipídica. A proteína GP1 é um tetrâmero que forma a cabeça da projeção, enquanto que o tetrâmero GP2 forma a haste ancorada na membrana do envelope viral (Figura 1.2). O SSP (5 kDa), que desempenha um papel crucial no tráfico das glicoproteínas através da via secretora, é o único componente que se mantém estávelmente associado ao complexo GP após a clivagem pela peptidase (Eichler et al. 2003, 2004, York & Nunberg 2006).

A proteína viral mais abundante, a NP que possui cerca de 70 kDa, está associada ao RNA genômico em estruturas circulares formando o nucleocapsídeo. A RpRd (200-250 kDa), que possuiu uma atividade de transcriptase e replicase, também está associada ao nucleocapsídeo. A proteína Z (10-14 kDa), uma pequena proteína estrutural com um domínio de ligação de zinco (*RING finger motif*), se liga com a polimerase viral e inibe a transcrição e a replicação (Meyer & Southern 1994, Meyer et al. 2002, Shtanko et al. 2010). Os grânulos elétron-denso que fornecem aos arenavírus sua aparência de “areia” foram identificados como sendo os ribossomos das células hospedeiras, cuja função ainda não está definida.

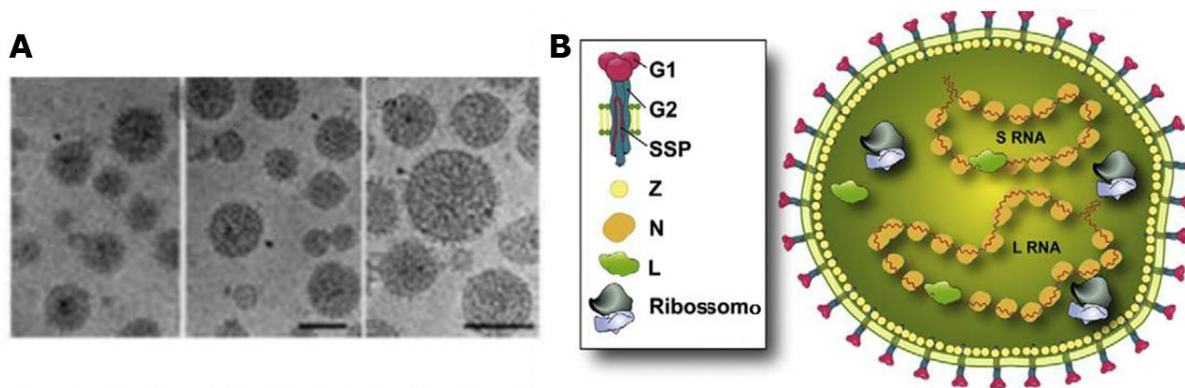


Figura 1.2. Morfologia e estrutura do gênero *Arenavirus* (A) Imagens de microscopia crio-eletrônicas de partículas virais purificadas não coradas congeladas no gelo vítreo, tomadas em 1,5; 3 e 4 microns (B) ilustração esquemática do gênero *Arenavirus* (Rodas & Salvato 2006, Gomez et al. 2011).

1.2.2. Classificação Taxonômica

Os arenavírus são membros da família *Arenaviridae* que é constituída por um único gênero, *Arenavirus*, atualmente composto por 25 espécies virais reconhecidas pelo *International Committee for Taxonomy of Viruses* (ICTV). O protótipo dessa família, o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV), foi identificado, praticamente, ao mesmo tempo por três grupos de pesquisa distintos, na década de 1930 (Armstrong & Lillie 1934, Rivers & Scott 1936, Traub 1936). No ano de 1970, Rowe e colaboradores propuseram o nome desta “nova” família viral com base no aspecto dos grânulos visualizados nas partículas virais em secções ultrafinas (*arenosus* = areia em latim). Originalmente proposto como *Arenovirus*, em decorrência da possibilidade de confusão com os adenovírus, o nome foi posteriormente alterado para *Arenavirus* (Rowe et al. 1970).

Os critérios de demarcação de espécies originalmente estabelecidos pelo ICTV são: (1) associação com uma espécie de hospedeiro específica ou um grupo de espécies interrelacionadas; (2) estar presente em uma área geográfica definida; (3) ser agente etiológico (ou não) de doença em seres humanos; (4) possuir diferença significativa na reatividade antigênica cruzada, incluindo os testes de neutralização cruzada, quando aplicáveis, e (5) possuir diferença significativa nas sequências nucleotídicas quando comparado com as demais espécies incluídas

no gênero; para este último critério, as fronteiras entre espécies não são claramente determinadas (Salvato et al. 2005a).

Assim, um novo isolado será considerado uma nova espécie se não existir compartilhamento de quatro ou cinco características comuns com os demais membros do gênero, enquanto que uma espécie “tentativa” será proposta se o isolado apresentar no mínimo duas diferenças com qualquer outro arenavírus (Salvato et al. 2005a). No entanto, o cumprimento desses critérios nem sempre é possível, já que nem todas as espécies descritas se enquadram nos critérios acima mencionados.

Alguns arenavírus foram isolados apenas de pacientes humanos, o que impossibilita a identificação do hospedeiro do vírus, como é o caso do vírus Sabiá e, mais recentemente, dos vírus Chapare e Lujo (Coimbra et al. 1994, Delgado et al. 2008, Briese et al. 2009). Além disso, a reatividade antigênica cruzada de um novo isolado pode ser difícil de determinar, uma vez que requer infra-estrutura laboratorial e instalações para trabalho em condições de nível de biossegurança 4 (NB-4) para a manipulação de isolados de diferentes arenavírus para fins comparativos (Emonet et al. 2009).

Essas dificuldades levaram os diferentes grupos a adotarem critérios genéticos para definir novas espécies do gênero *Arenavirus*. Bowen e colaboradores (Bowen et al. 2000) propuseram o uso de um valor de corte utilizando uma distância p não corrigida de 12% de aminoácidos da NP. A justificativa se baseia no fato de que essa é a maior distância intra-espécie relatada e a menor distância interespecies entre os arenavírus. Vale ressaltar que esse critério foi projetado para sequências completas da NP. Apesar da possibilidade de definir valores de cortes distintos para as diferentes espécies e linhagens já descritas, no presente momento, é provável que o aumento do número de sequências disponíveis nos bancos de dados, em breve, torne esses valores e alguns critérios obsoletos (Charrel & de Lamballerie 2010, Zapata & Salvato 2013). Portanto, ao invés de propor valores de corte, alguns autores preferem recomendar uma investigação da diversidade genética das sequências homólogas entre espécies mais próximas e o uso desta informação em conjunto com outros critérios propostos pelo ICTV para desenvolver a classificação taxonômica de vírus recém-descobertos, respeitando suas especificidades (Charrel et al. 2008, Emonet et al. 2009).

1.2.3. Replicação

Os arenavírus possuem um ciclo de replicação restrito ao citoplasma da célula. Cada segmento de RNA genômico se utiliza de uma estratégia de codificação *ambisense* para a síntese de dois polipeptídios em orientações opostas, separados por uma região intergênica não codificante (IGR) que forma uma estrutura estável, semelhante a um grampo de cabelo (Figura 1.3) (Meyer et al. 2002, Buchmeier et al. 2007). Os mRNAs virais são não poliadenilados e possuem um número extra de nucleotídeos não “*templates*” nas extremidades 3' e um “*Cap*” nas suas extremidades 5'. O mapeamento de diversas regiões da IGR levou à proposta de que a IGR serve como um autêntico sinal de término da transcrição, fato que foi confirmado por estudos mais recentes utilizando a tecnologia genética reversa (Meyer & Southern 1994, Tortorici et al. 2001, López & Franze-Fernández 2007, Qi et al. 2010).

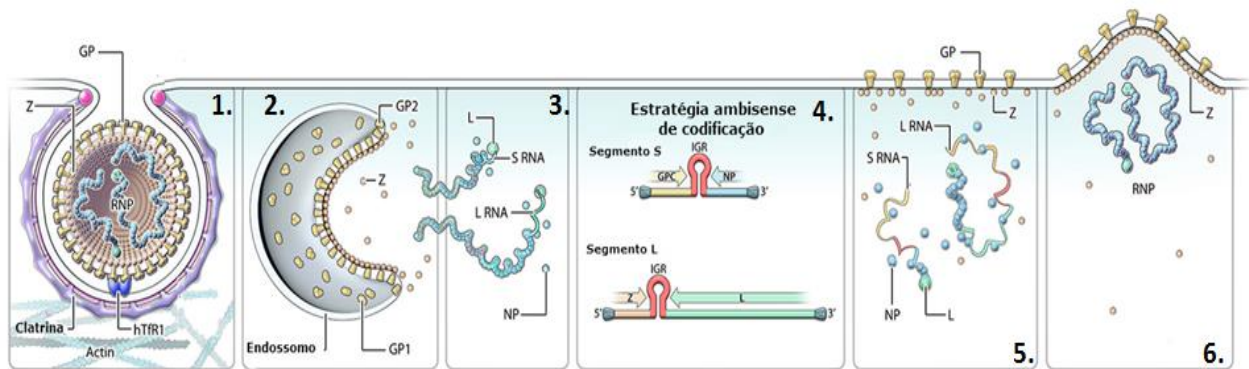


Figura 1.3. Esquema do ciclo de replicação dos arenavírus do Novo Mundo (1) a glicoproteína 1 (GP1) interage com o receptor de transferrina humana 1 (hTfR1) - o vírus é internalizado pela célula por endocitose mediada por clatrina; (2) fusão entre o vírus e o endossomo - mediado pela GP2 com liberação da GP1; (3) desnudamento;(4) transcrição, tradução e replicação dos dois segmentos genômico;(5) montagem da partícula viral e (6) morfogênese e egresso do vírus da célula por brotamento (Radoshitzky et al. 2012).

A projeção GP1 está localizada na parte superior da partícula viral e é responsável por mediar interação dos arenavírus com os receptores de superfície das células alvo. O receptor celular para os vírus LCM e LAS é o α -dístroglicano (α -DG) (Cao et al. 1998, Spiropoulou et al.

2002). Recentemente as famílias TAM (Axl e Tyro3) e lectina tipo C (DC-SIGN e LSECtin) também foram caracterizadas como receptores para o LASV (Shimojima & Kawaoka 2012). Após a ligação inicial à célula alvo, os arenavírus do Velho Mundo (VM) e os membros da Clade C do Novo Mundo (NM), que caracteristicamente não estão associados com clatrina, são envolvidos por vesículas de parede lisa (Borrow & Oldstone 1994). Em contraste, os arenavírus da Clade B do NM podem utilizar o receptor de transferrina humana 1 (hTfR1) como receptor celular (Radoshitzky et al. 2007) e a endocitose parece ser dependente de clatrina (Martinez et al. 2007). A fusão entre as membranas viral e celular é desencadeada pela acidificação do ambiente do endossoma, o que parece alterar a conformação das GPs dos arenavírus, expondo um peptídeo fusogênico (Castilla et al. 1994, Di Simone et al. 1994, Di Simone & Buchmeier 1995, York & Nunberg 2006), evento que auxilia a fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira (Gallaher et al. 2001, Eschli et al. 2006).

Após liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula infectada, a polimerase viral inicia os processos biossintéticos envolvidos na replicação do RNA e na transcrição gênica (Figura 1.4). A transcrição primária se inicia na região promotora do genoma localizada na extremidade 3' resultando na síntese dos mRNA da NP e da proteína L dos segmentos S e L, respectivamente. Posteriormente, a polimerase viral pode adotar a função de replicase se movendo através da IGR para gerar uma cópia antígenoma da molécula RNA (agRNA). Este agRNA servirá como molde para a síntese dos mRNAs das proteínas GPC (segmento S) e Z (segmento L). As moléculas de agRNA vão servir também como moldes para a amplificação de RNA correspondentes ao genoma dos arenavírus (Buchmeier et al. 2007, Emonet et al. 2009).

O transporte do complexo GPC ocorre através do retículo endoplasmático e pelo Golgi (Urata & Yasuda 2012), seguido pela clivagem pós-traducional do GPC com a geração dos três componentes que formam o complexo GPC: o SSP, GP1 e GP2 (Buchmeier et al. 2007). A geração de GP1 e GP2 parece ser mediada pela protease celular SKI-1/S1P para os arenavírus do VM (Lassa e LCMV) e para os causadores de febre hemorrágicas nas Américas, isto é, para os vírus Junín, Machupo, Guanarito, Sabiá e Chapare (Beyer et al. 2003, Kunz et al. 2003, Pinschewer et al. 2003a, b, Rojek et al. 2008). Os trímeros de GP1/GP2 se associam através de interações iônicas para formar as projeções da superfície viral. Assim como a maioria dos vírus de RNA de polaridade negativa, os arenavírus são liberados por brotamento da ribonucleoproteína (RNP) viral, cuja montagem associada à superfície das membranas de células

infectadas possibilita a expressão das GPs virais dos arenavírus as mesmas (Figura 1.3) (Perez & de la Torre 2003, Strecker et al. 2003, Urata et al. 2006, Wolff et al. 2013).

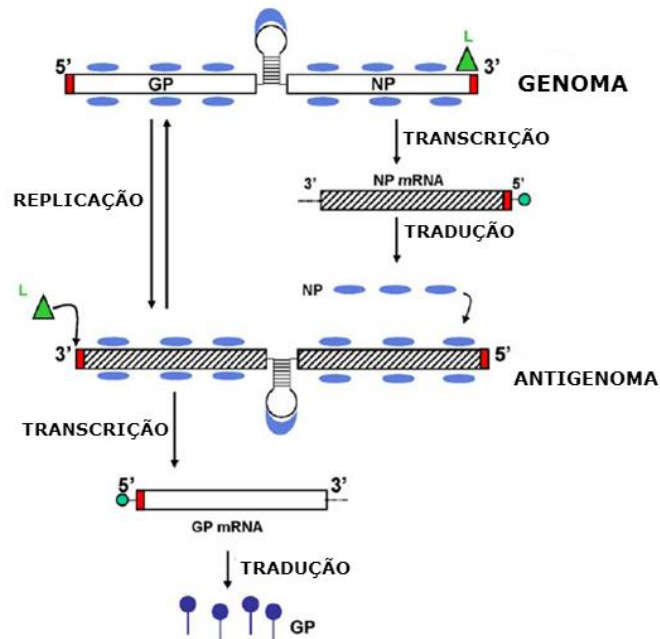


Figura 1.4. Esquema representativo da estratégia de replicação *ambisense* dos *Arenavirus* (Adaptado de Emonet et al. 2009).

1.2.4. Relações Genéticas e Antigênicas

Os arenavírus, de acordo com sua distribuição geográfica, propriedades antigênicas e variabilidade genética, têm sido classificados em dois grandes grupos (Salvato et al. 2005b): (i) o grupo do VM (sorocomplexo Lassa - vírus da coriomeningite linfocítica) composto principalmente por vírus do continente africano e (ii) o grupo do NM (sorocomplexo Tacaribe), composto por todos os arenavírus identificados nas Américas.

O grupo do VM é composto pelo vírus Lassa, LCMV, Ippy, Mobala, Mopeia, Lujó e Luna que estão relacionados aos roedores da família *Muridae*, subfamília *Murinae*. Os arenavírus do NM, filogeneticamente, se dividem em três linhagens, conhecidas como Clade A, B e C (Figura 1.5). Enquanto a Clade C inclui apenas os vírus Oliveros e Latino, a situação é mais complexa para as outras clades. A Clade B possui oito membros (vírus Machupo, Junín, Tacaribe, Sabiá, Guanarito, Amapari, Cupixi e Chapare). Todos os vírus patogênicos

identificados no Novo Mundo, até o momento, estão incluídos nessa clade, não importando o gene utilizado na análise. A clade A pode ser dividida em A e A-recombinante (A-rec), devido à origem quimérica do segmento S dos arenavírus norte-americanos. Fazem parte desta clade os vírus Pichinde, Pirital, Paraná, Flexal, Allpahuayo, na Clade A e Tamiami, Whitewater Arroyo, Bear Canyon que fazem parte da Clade A-rec. Até o momento, os arenavírus do NM identificados estão relacionados aos roedores da subfamília *Sigmodontinae* e *Neotominae* (Charrel et al. 2002, 2008, Salvato et al. 2005b, Charrel & de Lamballerie 2010).

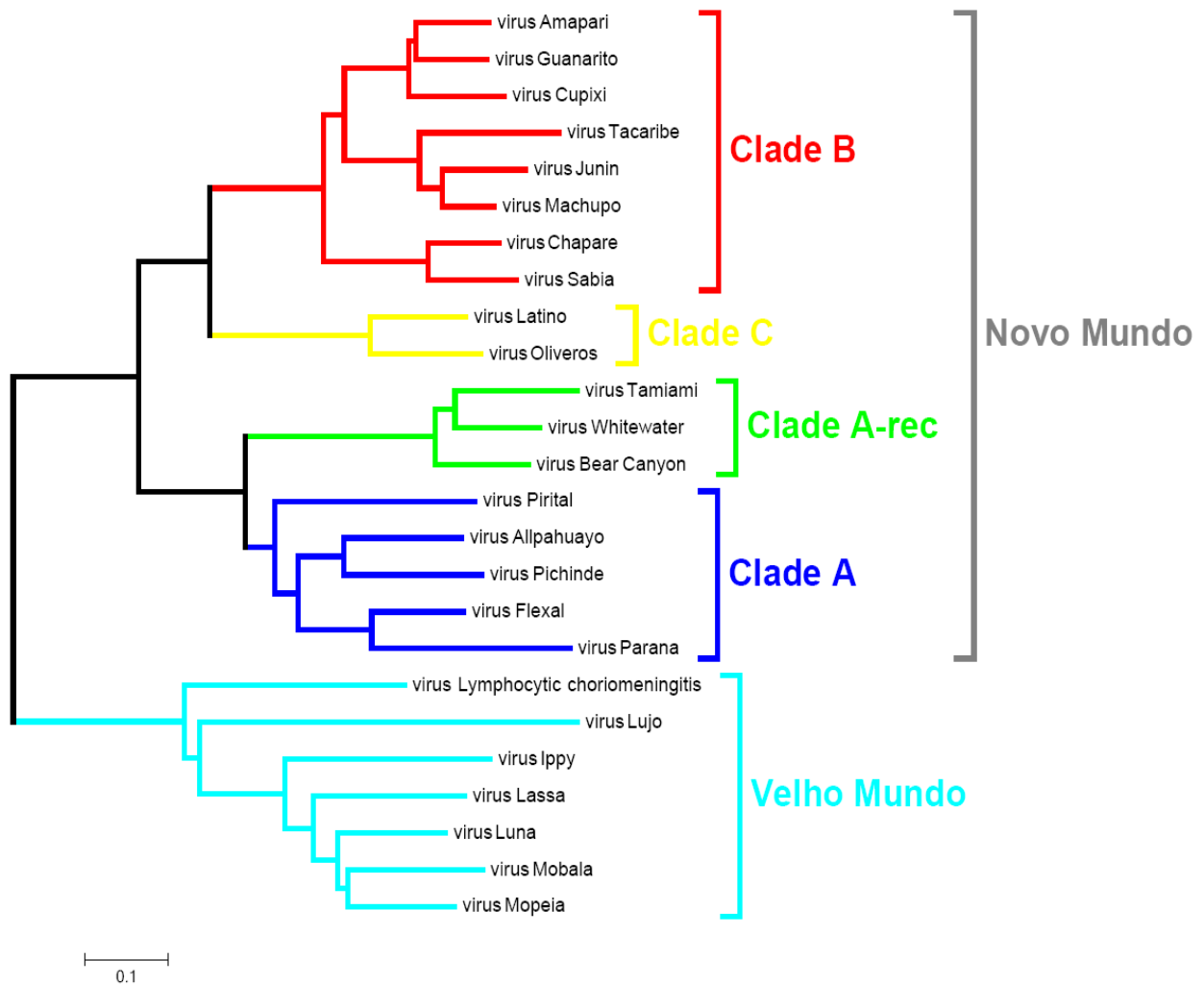


Figura 1.5. Ilustração das relações filogenéticas entre a nucleoproteína das 25 espécies de arenavírus reconhecidas pelo *International Committee for Taxonomy of Viruses* (ICTV).

Recentemente, novos arenavírus foram identificados em serpentes (*Boa constrictor* e *Corallus annulatus*) e as evidências apontam que estes vírus seriam os agentes etiológicos de uma doença “comum” entre cobras mantidas em cativeiro, o corpúsculo de inclusão (Stenglein et al. 2012). A dinâmica da infecção desses vírus entre as cobras e o possível risco de infecção em humanos ainda é totalmente desconhecido. O que se sabe é que esses novos membros do gênero *Arenavirus* são geneticamente distantes dos previamente descritos e formam um terceiro grupo no gênero (Bodewes et al. 2013, Hetzel et al. 2013). Este grupo parece ser ancestral aos demais e suas glicoproteínas possuem alta similaridade com os filovírus, reforçando a hipótese de que talvez as famílias Arenaviridae e Filoviridae tenham se originado a partir do mesmo ancestral comum (Gallaher et al. 2001).

Os arenavírus, assim como outros vírus de RNA, são altamente divergentes devido às altas taxas de mutação, consequência de uma RdRp viral de baixa fidelidade e do rearranjo, assim como, dos possíveis eventos de recombinação que contribuem para a diversificação viral durante a evolução (Albariño et al. 1998, Charrel et al. 2003). Embora seja possível produzir rearranjo de arenavírus *in vitro*, até o momento, não há registros desses vírus com rearranjo *in vivo* (Lukashevich 1992). Quanto à recombinação, parece ser rara com ocorrência apenas entre vírus filogeneticamente relacionados (Archer & Rico-Hesse 2002, Charrel et al. 2002).

Neste cenário, é possível deduzir que o principal motor da evolução dos arenavírus é a alta frequência de erros de transcrição viral, considerando que a taxa de mutação estimada dos vírus de RNA varia de 10^{-3} a 10^{-5} por nucleotídeo incorporado durante a replicação (Holland et al. 1992, Drake & Holland 1999). Estes resultados são consistentes com a heterogeneidade genética observada entre os arenavírus (Sevilla & de la Torre 2006). A comparação de sequências de segmentos genômicos e de proteínas dos diferentes arenavírus demonstrou identidades específicas que variam de 90-95% entre isolados da mesma região geográfica e 78 a 86% de vírus isolados de diferentes regiões (Fulhorst et al. 2001, Charrel et al. 2008). A diversidade genética dentro e entre os grupos de arenavírus isolados sugere que essa heterogeneidade está refletida na gama de hospedeiros e na capacidade de causar doença no homem sobre diferentes formas clínicas (Blasdell et al. 2008).

Diante desta diversidade, considerando que as proteínas com propriedades imunogênicas mais acentuadas são a NP e as GPs, estudos têm revelado que existe uma reação sorológica cruzada entre os anticorpos usados para identificar os arenavírus do NM e do VM em testes de

neutralização cruzada e ou fixação de complemento (Webb et al. 1969, J Casals 1975). Os anticorpos monoclonais produzidos contra o GP2 de dois arenavírus africanos reagiram amplamente contra arenavírus americanos, demonstrando epítomos altamente conservados nesta família (Ruo et al. 1991). De uma forma mais estrita, anticorpos monoclonais contra a NP do vírus Junín reagiu apenas com arenavírus do NM ou reagiram apenas com isolados locais, o que sugere uma forte estabilidade antigênica desses vírus em certas áreas (Sanchez et al. 1989). Apesar desses resultados, várias tentativas falharam para definir mais claras diferenças sorológicas entre arenavírus úteis para classificação das espécies (Howard 1993).

1.3. Febres Hemorrágicas Americanas

Diante da escassez de informações sobre as febres hemorrágicas causadas por arenavírus no Brasil, onde existe um grande número de doenças endêmicas com características clínicas e epidemiológicas semelhantes às arenaviroses, entre elas, a dengue, febre amarela e malária, neste tópico, serão abordados, além da patogenia e da imunologia, aspectos históricos das arenaviroses americanas, com descrição dos casos e surtos identificados desde a década de 1950.

1.3.1 Patogenia e Resposta Imunológica

O conhecimento sobre a patogenia e a imunologia em resposta à infecção por arenavírus ainda é escasso e controverso. O principal modelo de FHA por arenavírus na América do Sul é o vírus Junín (JUNV), que será utilizado como modelo nesta seção para exemplificar o conhecimento existente sobre a patogenia e a resposta imune das FHAs.

A transmissão dos arenavírus ocorre principalmente pela inalação de aerossóis. A inalação de partículas virais parece resultar na infecção de macrófagos alveolares, seguida pela migração destes macrófagos infectados para os linfonodos. À medida que o vírus se replica, ele se dissemina através do sistema vascular para os rins, suprarrenais, pulmões, endotélio vascular, sistema nervoso central e para órgãos linfóides (Grant et al. 2012).

Os arenavírus do NM invadem as células através de ligação com os receptores hTfR1, expressos em uma grande variedade de tipos de células, cuja função é mediar a endocitose de transferrina ligada ao ferro e transportar o ferro através da membrana celular, para a sua subsequente liberação no citoplasma. Este evento, conseqüentemente, permite a infecção

pantrópica observada durante as infecções por arenavírus do NM (Andrews et al. 1978, Radoshitzky et al. 2007).

Os macrófagos são alvos celulares principais na infecção por arenavírus (McKee et al. 1987). Na década de 1980, em uma série de casos de FH Argentina (FHAr) foi possível demonstrar os efeitos citopáticos nos macrófagos, nos quais foi identificada a brotação viral a partir da membrana plasmática, além de antígenos virais por imunofluorescência. A destruição dos linfonodos e de algumas áreas do baço também foi observada em casos fatais de FHAr, demonstrando o tropismo viral para o tecido linfático (González et al. 1980, Ambrosio et al. 1986, 1990). Desta forma, o tropismo do JUNV por macrófagos pode ser um importante mecanismo de evasão do sistema imunológico e também desempenhar um papel na síndrome de choque fatal que ocorre em alguns graves de FHAr (Mclay et al. 2013).

Embora uma imunossupressão generalizada seja a principal característica da infecção pelo LASV), nos pacientes infectados pelo JUNV o que se observa predominantemente são os elevados níveis de citocinas. Indivíduos com FHAr apresentam aumentos nos níveis de TNF, IFN, IL-6 e IL-10 (Levis et al. 1985, Heller et al. 1992, Marta et al. 1999). Os pacientes com a doença exacerbada e casos fatais demonstram consistentemente níveis elevados de TNF e IFN (Levis et al. 1985, Heller et al. 1992). Curiosamente, embora estes níveis aumentados de citocinas sejam observados em pacientes infectados por JUNV, macrófagos infectados *in vitro* não apresentam qualquer aumento na produção de citocinas, tais como IFN, TNF, IL-10, IL-6 e IL-12 (Groseth et al. 2011). Assim, a partir deste estudo foi possível concluir que o aumento dos níveis de citocinas observado em pacientes com FHAr devem ser proveniente de outra fonte, possivelmente de células dendríticas, cujo papel na produção de citocinas induzidas pelo vírus JUN ainda não foi estabelecido (Mclay et al. 2013). Uma teoria proposta é de que as citocinas possam ser importantes no controle da replicação do vírus nas fases iniciais da infecção e que uma resposta atrasada possa contribuir para uma evolução mais grave da doença (Groseth et al. 2011).

Inversamente ao que se observa com os pacientes com quadro hemorrágico, a presença de dano vascular limitado é frequente e característico nos pacientes que sofrem de FH causada pelo JUNV (Weissenbacher et al. 1987). O receptor para JUNV, o TfR1, é altamente expresso em células endoteliais vasculares e estas células suportam elevados níveis de replicação do vírus, como observado *in vitro* (Andrews et al. 1978, Radoshitzky et al. 2007).

Embora os arenavírus não sejam citopatogênicos e não causem lesões vasculares *in vivo* (Weissenbacher et al. 1987, Gomez et al. 2003), a infecção experimental das células endoteliais tem demonstrado um aumento na produção de óxido nítrico (NO) e de prostaglandina PGI₂ (Gomez et al. 2003). Assim, a liberação destes mediadores vasoativos pode ser a causa do aumento da permeabilidade vascular durante a infecção de células endoteliais pelo JUNV que contribuem para o choque posterior observado nos pacientes com a forma grave da FHAr (Mclay et al. 2013).

Células endoteliais experimentalmente infectadas pelo JUNV apresentam um aumento da expressão de moléculas de adesão celular - ICAM-1 e VCAM-1- e níveis reduzidos do factor de coagulação de von Willebrand (FVW), embora, contraditoriamente, os pacientes com FHAr apresentam níveis de FVW aumentado em amostras de soro (Molinas et al. 1989, Gomez et al. 2003). Esta discrepância sugere que o FVW seja proveniente de uma outra fonte e não das células endoteliais. Em adição, considerando a capacidade do plasma de pacientes com FHAr em inibir a agregação de plaquetas normais *in vitro*, uma característica também encontrada em pacientes infectados por outros arenavírus, tem sido hipotizada a existência de um desconhecido inibidor da agregação de plaquetas no plasma (Cummins et al. 1990). Ainda no contexto do quadro hemorrágico observado nos indivíduos infectados pelo JUNV, a trombocitopenia, as atividades do complemento e de coagulação do sangue se apresentam reduzidas e contribuem para a coagulopatia e edema observado na FHAr (de Bracco et al. 1978, Heller et al. 1995).

Em estudos experimentais de infecção em macacos rhesus, saguis e porcos-da-índia pelos arenavírus causadores de febres hemorrágicas, foi possível reproduzir lesões semelhantes a casos humanos notificados de FHAr. Os achados mais comuns foram: hemorragia, necrose da medula óssea, necrose hepatocelular leve e encefalomielite (Kastello et al. 1976, Green et al. 1987). Embora muitas vezes haja necrose de linfócitos adjacentes, os macrófagos são as células mais frequentemente envolvidas (González et al. 1980). No rim, um grande número de partículas intracitoplasmáticas semelhantes aos arenavírus foram encontradas nos túbulos distais, em concordância com a necrose tecidual grave e a presença de grande quantidade de antígeno de JUNV que têm sido demonstrado em estudos morfológicos (Cossio et al. 1975). Por fim, estudos morfológicos realizados com tecido da medula óssea têm demonstrado que existe um sequestro agudo e transiente de hematopoiese, com hipocelularidade, mas sem sequelas hematológicas permanente em sobreviventes (Ponzinibbio et al. 1979).

1.3.2. Febre Hemorrágica Argentina

A FHAr, uma doença febril aguda com manifestações hemorrágicas e neurológicas, foi descrita por Arribalzaga em 1955 na região agrícola da Argentina. Essa doença ocorria de forma epidêmica ao redor do município de Junín desde 1943. No entanto, o JUNV só foi descoberto oito anos após sua descrição inicial por Parodi e colaboradores (1958) e posteriormente confirmado por Pirotsky e colaboradores uma década depois (1959), quando surtos anuais de FHAr vinham sendo registrados sem interrupção (Enria et al. 1998a).

O principal reservatório natural do JUNV é o roedor *Calomys musculinus*, embora esse vírus também já tenha sido isolado dos órgãos e fluidos corporais de outros roedores como *C. laucha* e *Akodon azarae* e, ocasionalmente, de *Mus musculus*, *Necromys obscurus* e *Oligoryzomys flavescens* (Mills et al. 1991, Sabattini et al. 1997). A espécie *C. musculinus* apresenta hábitos generalistas e, embora mais frequentemente capturado em ambientes de fronteira estável, pode ser encontrada em campos de cultivo e pós-colheita se alimentando de grãos de milho e soja. Este roedor é raramente capturado dentro ou ao redor das habitações humanas, embora possa habitar parques e as redondezas de áreas subdesenvolvidas adjacentes aos pampas argentinos (Mills et al. 1992, Ellis et al. 1997).

A área endêmica da FHAr inclui apenas uma parte da distribuição geográfica das espécies *C. callosus*, que é comum e amplamente distribuído na Argentina central e noroeste. A incidência anual de HFAr está diretamente associada com densidades populacionais locais do reservatório, que atinge sua densidade máxima durante o outono, coincidindo com a colheita das principais plantações iniciadas no verão (Nowak 1991, Mills et al. 1992).

Acredita-se que o JUNV se mantém nas populações de roedores em ciclos enzoóticos principalmente através de transmissão horizontal por encontros agonistas (Mills et al. 1994) e que, quando transmitido verticalmente, podem ter efeitos deletérios importantes sobre esses animais. Os recém-nascidos da espécie *C. musculinus* experimentalmente infectados com o JUNV têm alta mortalidade (70%), os sobreviventes apresentam baixo desempenho e fecundidade reduzida com viremia e virúria persistentes (Vitullo et al. 1987, Vitullo & Merani 1988). Em contrapartida, os animais adultos infectados demonstram padrões diferentes de resposta: (i) metade dos animais desenvolvem anticorpos com *clearance* viral, (ii) o restante

desenvolve viremia crônica com eliminação persistente do vírus na urina e na saliva, sem nenhum efeito deletério aparente (Vitullo & Merani 1990).

Estudos de populações de roedores silvestres demonstram que a infecção em *C. musculus* é mais frequente entre machos do que fêmeas e está diretamente correlacionada com a idade e a presença de feridas ou cicatrizes nesses animais, sugerindo que encontros agressivos entre os machos adultos possam ser um importante mecanismo de transmissão dentro das populações de reservatórios. Embora a infecção no roedor reservatório possa ser alta, ela geralmente é baixa, mesmo em locais com um alto número de casos de FHAr (Mills et al. 1991). Estudos eco-epidemiológicos têm demonstrado que há uma predominância de *C. musculus* em habitats lineares, como beiras de estradas, apontando para um diferente padrão, no que diz respeito ao ambiente da infecção, levando a crer que as infecções humanas ocorrem no contato com roedor ao longo das bordas dos campos ou beiras de estradas, ao entrar ou ao sair dos campos, e não dentro deles durante a colheita (Mills et al. 1992).

Outros fatores, além da presença do roedor infectado, estão associados à incidência de FHAr. Fatores climáticos são importantes por sua influência direta na densidade populacional dos roedores. Nos pampas argentinos, a precipitação e a temperatura têm sido documentados e os dados demonstram que os verões mais quentes e secos seguidos de invernos rigorosos e chuvosos contribuem para a diminuição da densidade de roedores e conseqüente diminuição do número de casos de FHAr (Mills et al. 1991, 1992). Alterações nos principais tipos de grãos cultivados na região, alterações antropogênicas (queimadas, desmatamentos) no habitat natural de *C. callosus*, e variação na intensidade do uso de inseticidas e herbicidas de acordo com as condições econômicas do produtor são outros fatores de importância que têm sido implicados no aumento ou diminuição da incidência da doença (Maiztegui & Sabattini 1977).

A FHAr ocorre nos pampas úmidos, a área mais fértil da Argentina, que dependem da agricultura para a sua prosperidade. A área endêmica da FHAr é em grande parte uma colcha de retalhos de campos de cultivo, cortada por linhas lineares de habitats de fronteiras relativamente estáveis a partir de estradas, rodovias, linhas de cercas e ferrovias (Enria et al. 1998b).

Uma característica epidemiológica marcante da FHAr é a sua expansão geográfica constante e progressiva, que ocorreu rapidamente nos anos seguintes à sua descoberta e que continua até o presente. Em 1958, os casos estavam limitados a uma área de aproximadamente 16.000km², com cerca de 270.000 pessoas vivendo em áreas de risco. Atualmente, a região

endêmica/epidêmica abrange uma área de cerca de 150.000 km² com 3 milhões de habitantes, abrangendo as províncias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fé e La Pampa (Figura 1.6) (Maiztegui et al. 1986, Enria et al. 1998b, Ambrosio et al. 2011).

A incidência da FHAr não é a mesma em diferentes áreas dos pampas argentinos ou em diferentes anos. Em geral, é mais elevada durante um período de 5 a 10 anos nas áreas recém envolvidas e depois tende a diminuir. A extensão geográfica da FHAr na última década têm sido menor do que a observada anteriormente. No entanto, verifica-se um aumento, contínuo e moderado, da extensão geográfica rumo ao norte seguindo a distribuição do roedor reservatório, assim como uma reemergência nas áreas históricas onde a doença clínica não havia sido notificada nos últimos 10 anos (Garcia et al. 1996).

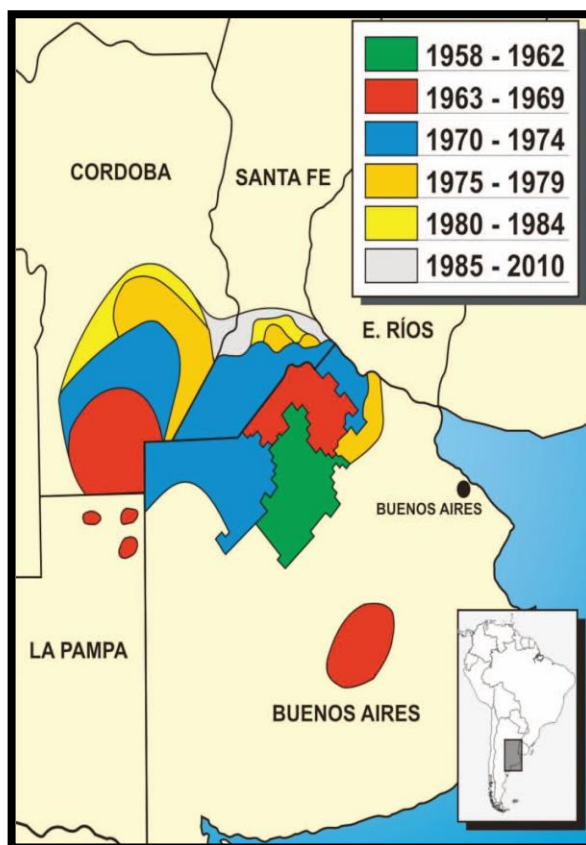


Figura 1.6. Extensão progressiva da febre hemorrágica argentina no período de 1958 a 2010 (Adaptado de: Ambrosio et al. 2011).

As epidemias de FHAr ocorrem anualmente com um número variável de casos, de históricos 3.500 a 30-50 casos confirmados, atualmente, por ano (Ambrosio et al. 2011). Casos

da doença ocorrem ao longo do ano, predominantemente, durante o outono e inverno, o principal período de colheita na Argentina, com um pico de incidência no mês de maio (Garcia et al. 1996).

A doença é quatro vezes mais prevalente em homens do que em mulheres e entre trabalhadores rurais, na faixa etária ampla de 15 a 65 anos. Crianças menores de 14 anos de idade constituem cerca de 10% dos casos anuais, sendo rara em indivíduos com menos de 4 anos de idade e, excepcional, naqueles com menos de 2 anos de vida. A distribuição sazonal da doença e a alta prevalência em trabalhadores rurais masculinos refletem a exposição ocupacional dos seres humanos ao roedor reservatório do JUNV. A incidência anual dentro da área endêmica pode ser tão baixa quanto 1 em 100.000, mas nas áreas de maior atividade que atinge 140 por 100.000 habitantes e 355 por 100.000 homens adultos (Enria et al. 1986, 1998b).

Nos primeiros anos do reconhecimento da FHAr, os indivíduos infectados trabalhavam em contato direto com a terra com as colheitas realizadas manualmente. Com o avanço da tecnologia na agropecuária, as práticas agrícolas mecanizadas tornaram-se comuns na região, mas os trabalhadores do campo, especialmente os motoristas de trator, continuaram a se infectar (Enria et al. 1998a). A infecção dessa população parece estar associada com a inalação de aerossóis infecciosos gerados durante o processo de colheita mecanizada ou com exposição a aerossóis primários de urina de roedores infectados ou contato com materiais contaminados. De uma forma geral, a FHAr não é contagiosa, apesar da transmissão pessoa-pessoa já ter sido documentada através de contato íntimo entre pacientes convalescentes e suas parceiras (Briggiler et al. 1987).

A FHAr possui um início insidioso, após um período de incubação que pode variar, em média, de 4 a 21 dias. Inicialmente o indivíduo infectado apresenta calafrios, mal-estar, anorexia, cefaleia, mialgias e hipertermia moderada. Depois de dias, surgem manifestações gastrointestinais, neurológicas, cardiovasculares, além de sinais e sintomas constitucionais caracterizados por dores nas costas, dor retro-orbitária, náuseas ou vômitos, fotofobia e tonturas. Na primeira semana de doença, ao exame físico se observa rubor de face, pescoço e da parte superior do tórax, hiperemia conjuntival e edema periorbital. As membranas da orofaringe estão congestionadas e as gengivas podem sangrar espontaneamente ou sob uma ligeira pressão. Um enantema caracterizado por petéquias e pequenas vesículas é quase sempre encontrada no palato mole (Figura. 1.7) (Maiztegui 1975, Harrison et al. 1999).

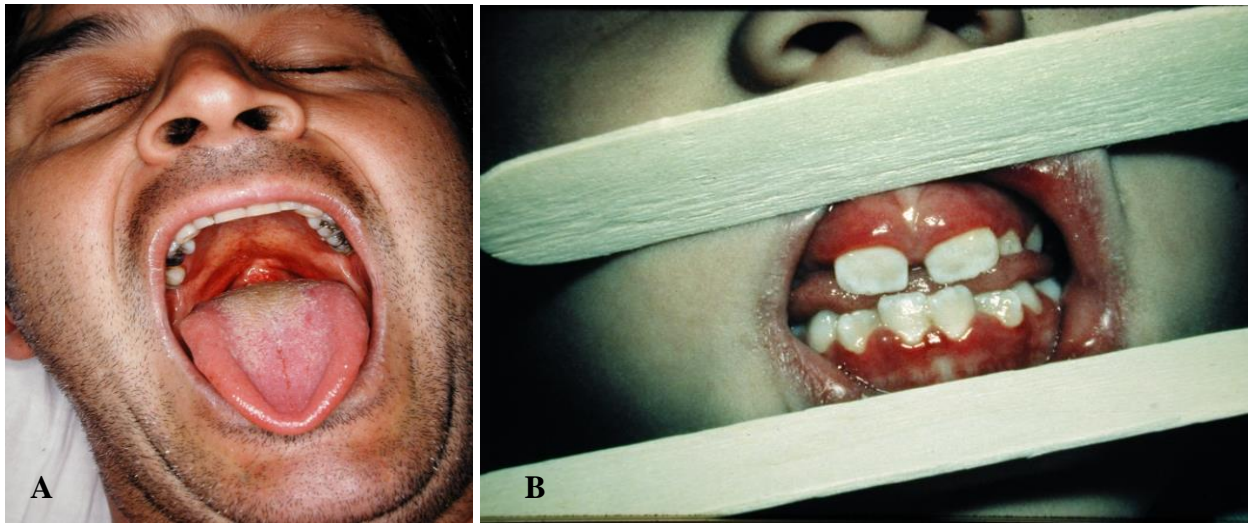


Figura 1.7. Febre hemorrágica argentina: (A) Enantema em palato mole e (B) gengivas hiperemiadas com sangramento espontâneo. Fotos gentilmente cedidas pela Dr^a Silvana Levis (Instituto de Doenças Virais *Dr. Julio I. Maiztegui* (INEVH) /Argentina).

A maioria dos pacientes tem petéquias cutâneas nas regiões axilares, parte superior do tórax e braços. Os gânglios linfáticos tornam-se maiores, principalmente nas regiões cervical e lateral. Bradicardia e hipotensão ortostática são comuns. Geralmente não há hepatomegalia ou esplenomegalia e icterícia é muito rara. No fim da primeira semana de evolução, oligúria e diferentes graus de desidratação podem ocorrer. Sinais neurológicos como irritabilidade, letargia, leves tremores da mão e língua são comuns. Ataxia moderada, hiperestesia cutânea e uma diminuição dos reflexos e da tonicidade muscular também podem estar presentes. Nas mulheres infectadas é comum uma metrorragia leve ou moderada e, em alguns casos, pode ser o primeiro sinal clínico da doença (Ambrosio et al. 1990, Enria et al. 1998b, Harrison et al. 1999).

Durante a segunda semana da doença, embora cerca de 70% a 80 % dos doentes apresentem melhora clínica, o quadro clínico pode se agravar, entre o 8º e 12º dia após o início da doença, com surgimento de hemorragias graves como hematêmese, melena, hemoptise, epistaxe, hematomas, metrorragia, ou hematúria, além de manifestações neurológicas, choque e infecções bacterianas secundárias como pneumonia e septicemia. As manifestações neurológicas graves geralmente começam com confusão mental, aumento da irritabilidade e da intensidade dos tremores, que são seguidos de delírio, convulsões generalizadas, edema cerebral e coma. A

maioria dos casos graves de FHAr apresenta manifestação neurológica. A insuficiência renal aguda é rara, mas pode ocorrer em casos terminais ou após períodos prolongados de choque, consequente à necrose tubular aguda (Maiztegui 1975, Vitullo & Merani 1988, Enria et al. 1998a, Harrison et al. 1999).

Evolutivamente, entre a segunda e a terceira semana de doença, passando por um período de convalescença prolongada, ocorre a recuperação do paciente que pode evoluir com alopécia, astenia, irritabilidade e alterações de memória que desaparecem gradualmente ao longo de um período de 1 a 3 meses (Maiztegui 1975, Vitullo & Merani 1988).

Casos de FHAr durante a gravidez não são comuns, mas a letalidade pode ser maior do que 50% em mulheres que contraem a doença no último trimestre da gestação, devido ao reconhecimento tardio da doença e à incapacidade de administrar o tratamento específico. Malformações congênitas, morte fetal e morte do recém-nascidos também foram relatados. (Briggiler et al. 1990). Crianças tendem a ter um curso clínico mais brando e, assim, casos fatais e graves são pouco comuns nessa faixa etária. O tratamento da FHAr consiste em terapia específica e de suporte (Enria et al. 1998a).

O tratamento específico disponível para FHAr é a transfusão de plasma imune nos primeiros oito dias do início dos sintomas. Este tratamento reduz a taxa de letalidade (15% a 30%) para menos de 1% e é normalizado com base na quantidade de anticorpos neutralizantes contra JUNV infundidos (Maiztegui et al. 1979, Enria et al. 1984). A eficácia do tratamento com plasma hiperimune parece ser devido à capacidade de neutralização viral dos anticorpos já que os níveis de viremia de pacientes se apresentam reduzidos após a transfusão com plasma imune e os pacientes tratados com plasma, geralmente possuem títulos mais baixos na fase convalescente. Neste contexto, bancos de plasma foram criados em áreas endêmicas, a fim de coletar o soro de indivíduos que sobreviveram, considerando, no entanto, que o tratamento com plasma imune não acarreta nenhum benefício para os pacientes quando administrado oito dias após o início da doença (Enria & Maiztegui 1994).

Ainda, durante a fase de convalescência, 10% dos pacientes tratados com plasma imune desenvolvem uma síndrome neurológica tardia. Esta síndrome aparece depois de um período médio de 20 dias (de 7 a 80 dias), caracterizada por febre, sinais cerebelares e paralisia do nervo craniano, no qual o paciente não apresenta nenhuma manifestação semelhante às do período agudo FHAr. (Maiztegui et al. 1979, Enria et al. 1985). Durante a síndrome neurológica tardia, o

líquor pode conter dezenas a centenas de células com níveis normais de açúcar e proteínas ou níveis ligeiramente aumentados. A utilização de ribavirina endovenosa também pode ser útil no tratamento de pacientes com FHAr e talvez seja uma importante alternativa, uma vez que o número de indivíduos infectados com vírus da imunodeficiência humana (HIV) e hepatite C nos pampas esta cada vez maior, fazendo com que a seleção de doadores se torne mais difícil (Enria et al. 1987, Enria & Maiztegui 1994).

Em relação ao tratamento, medidas de suporte devem ser realizadas considerando a importância de uma hidratação adequada e a necessidade de controle das alterações neurológicas, da hemorragia, do choque e das infecções bacterianas secundárias. As injeções intramusculares e subcutâneas são totalmente contra-indicadas por causa do risco de hematomas e, embora as transfusões de plaquetas sejam realizadas, a natureza complexa da coagulopatia e a experiência clínica têm demonstrado que elas não são úteis (Maiztegui 1975).

Exames laboratoriais podem auxiliar no diagnóstico clínico precoce. Durante a fase aguda, é possível observar leucopenia e trombocitopenia com uma taxa de sedimentação normal ou reduzida. Quase invariavelmente, há proteinúria e sedimento urinário hialinos contendo hemácias. A creatinina sérica e ureia estão dentro dos limites normais ou aumentadas em proporção à desidratação e ao choque dos pacientes graves. Elevações discretas da aspartato transaminase (AST), creatina fosfoquinase (CPK) e lactato desidrogenase (LDH) são comuns e hiperbilirrubinemia ou hiperamilasemia são raros. Durante a doença aguda o líquido cefalorraquidiano é normal, mesmo em pacientes com doença neurológica grave (Maiztegui 1975, Vitullo & Merani 1988, Harrison et al. 1999).

Na FHAr, assim como nas outras FHA, a viremia ocorre durante todo o período febril agudo e o arnavírus pode ser facilmente isolado a partir de sangue e de tecidos linfóides de casos fatais. O isolamento, geralmente, é realizado em células Vero e a co-cultura de células mononucleares do sangue periférico melhora a sensibilidade na recuperação do vírus (Ambrosio et al. 1986).

A presença do vírus pode também ser detectada pelo ELISA ou pela reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) e, nos casos fatais, também pela imunohistoquímica (Peters et al. 1973, 1987). Embora os testes de neutralização apresentem maior sensibilidade e sejam importantes para confirmar as espécies de arnavírus em soros de pacientes, a dificuldade em sua execução, em decorrência da necessidade da manutenção de

diferentes espécies de arenavírus em laboratório NB-4 (Sanchez et al. 1989), faz com que o teste ELISA seja o método de escolha para o diagnóstico sorológico. A RT-PCR tem sido aplicada com sucesso e pode desempenhar um papel no estabelecimento de diagnóstico etiológico em doentes que evoluíram para o óbito antes do surgimento dos anticorpos específicos (Lozano et al. 1993, 1995).

Desde a identificação da FHAr, estratégias de controle e prevenção vêm sendo planejadas e desenvolvidas. Considerando, no entanto, a impossibilidade da eliminação de todos os roedores que funcionam como reservatórios do vírus JUN, esforços para reduzir a incidência FHAr foram voltados para obtenção de uma vacina.

Como resultado de um projeto internacional colaborativo, em 1979, uma cepa viral do JUNV foi desenvolvida e usada como princípio ativo para uma vacina chamada *Candid#1* (Barrera Oro & McKee 1991, McKee et al. 1993, Enria & Maiztegui 1994, Enria et al. 1998b). Os ensaios clínicos de fase I, II e III, realizados entre 1985 e 1990 demonstraram que a vacina *Candid#1* é segura imunogenicamente, com, aproximadamente, 95% de soroconversão e eficaz em homens entre 15 e 65 anos e que a resposta imunológica específica a partir da detecção de anticorpos neutralizantes se mantem por até 13 anos após a imunização em mais de 90 % dos vacinados (Levis et al. 1993, Maiztegui et al. 1998, Enria et al. 2010).

Até o momento, aproximadamente 330.000 doses da vacina *Candid#1* foram distribuídas em quatro províncias da Argentina: Buenos Aires, Córdoba, Santa Fé e La Pampa (Informe para la XXVII Reunion anual de la fiebre hemorrágica Argentina, Ministerio de Salud Argentino 2013). No entanto, a *Candid#1* é considerada uma vacina "órfã", por seu baixo apelo comercial, já que apenas um número restrito de doses são distribuídas anualmente e por seu uso limitado a uma região específica da Argentina, fazendo que não haja interesse comercial da indústria farmacêutica (Lang & Wood 1999).

Neste contexto, a vacina não foi aprovada pelo FDA, devido não somente à falta de documentação adequada, mas também pela falta de composição genética detalhada da cepa da vacina, pela associação com a doença de pé e boca em várias regiões da Argentina, e pelo desconhecimento da base molecular do fenótipo atenuado da *Candid#1* (Maiztegui et al. 1998, Ambrosio et al. 2011). A única mudança de resíduo, F427I, no domínio da glicoproteína G2 de transmembrana parece ser responsável pelo fenótipo atenuado, embora o mecanismo para este efeito continue por se resolver. Acredita-se que esta substituição não afete a capacidade do vírus

de utilizar o receptor Tfr1, mas possivelmente interfira na fusão ou na maturação viral (Albariño et al. 2011).

Com a falta de interesse das companhias farmacêuticas, o governo argentino decidiu patrocinar e investir na produção da vacina *Candid#1*, capacitando o *Instituto de Doenças Virais Dr. Julio I. Maiztegui* (INEVH) que assumiu a produção nacional da vacina (Ambrosio et al. 2006). Em 1991, decidiu-se vacinar populações adultas de alto risco para infecção pelo JUNV, em áreas selecionados por uma alta incidência de FHAr nos cinco anos anteriores à vacinação. As campanhas ocorreram até o ano de 2007, quando a vacina foi implementada no calendário nacional de vacinação argentino. A vacina é disponível para indivíduos maiores de 15 anos, de ambos os sexos, que residem ou exercem atividades em localidades das quatro províncias onde tenha ocorrido casos de FHAr nos últimos anos. A vacina é contra indicada para imunossuprimidos, gestantes ou mulheres que ainda estejam amamentando e indivíduos que tenham recebido vacinas ou mesmo gamaglobulinas a menos de um mês (Enria et al. 2010)

A vacinação de adultos em alto risco de exposição ao JUNV em 1991 e a introdução da vacina no calendário nacional em 2007 resultaram num declínio significativo do número de casos de FHAr. Estudos realizados pelas autoridades de saúde argentina demonstraram que de um total de 221 confirmados, entre 2001 e 2010, 147 (67%) eram do sexo masculino e 74 (33%) mulheres, 30 casos (14%) tinham menos de 15 anos e 179 (81%) tinham entre 15 e 65 anos. Uma análise das ocupações por parte dos pacientes, no momento da doença, sugere que apenas 15% eram, exclusivamente, trabalhadores rurais. Dos 20 casos fatais, apenas quatro (20%) trabalhavam no campo. Em comparação com o padrão clássico da FHAr, a proporção de mulheres infectadas aumentou e a prevalência de ocupações não agrícolas diminuiu (Ambrosio et al. 2011). Este novo cenário epidemiológico indica a necessidade de adaptar as estratégias de cuidados de saúde primários, a fim de alcançar o diagnóstico precoce e o tratamento da doença além da necessidade e da importância de se ajustar o programa de vacinação à disponibilidade de vacina e ao risco-benefício de sua aplicação.

1.3.3. Febre Hemorrágica Boliviana

Durante os anos de 1959-1962, casos isolados de uma doença conhecida como "tifo negro" foram observados principalmente entre os homens em áreas remotas do departamento de Beni na Bolívia. Os primeiros casos dessa doença ocorreram no início do ano de 1959 nos

arredores da cidade de San Joaquín. No final da década de 1950, com a tentativa sistemática, por parte do governo, de estabelecer nesse departamento a agricultura de subsistência, houve aumento do número de casos da doença, culminando, em 1962, com a ocorrência de 107 casos e 44 óbitos (41% de letalidade) em uma vila de 600 habitantes, na cidade de Orobayaya. Os moradores abandonaram as suas residências, casas foram queimadas, animais e terras foram deixados para trás já que as investigações do Ministério da Saúde boliviano e dos médicos locais não foram capazes identificar a etiologia e de desenvolver uma estratégia de controle. (Mackenzie et al. 1964a, Peters 2006). Até 1962, numa população de 4.000 a 5.000 habitantes das províncias de Itinez e Mamoré, aproximadamente 407 casos e 142 óbitos foram relatados ao Ministério da Saúde boliviano. No ano seguinte, a doença ultrapassou os arredores e avançou para o interior da cidade de San Joaquín, uma cidade que na época possuía cerca de 3.000 habitantes. Num período de um ano (1963 a 1964), ocorreram 637 casos (21% dos habitantes infectados), em pessoas de diferentes sexos, idades e ocupações, com aproximadamente 18% de letalidade (Mackenzie et al. 1964b, Vainrub & Salas 1994b).

Com o aumento do investimento nas pesquisas e com o auxílio de instituições internacionais, em 1963, o vírus Machuco (MACV), agente etiológico da febre hemorrágica boliviana (FHBo), foi isolado do baço de um caso fatal (Johnson et al. 1965).

Com características antigênicas semelhantes ao JUNV, os estudos tomaram novos rumos a procura de padrões semelhantes aos da FHAr (Wiebenga 1965). Extensos estudos foram realizados com capturas de pequenos mamíferos e artrópodes, mas o vírus foi apenas isolado de roedores da espécie *Calomys callosus*. Assim, foi possível concluir que o MACV infecta cronicamente estes roedores e que a transmissão ocorre diretamente para os seres humanos, da mesma forma que o JUNV na Argentina (Johnson et al. 1966). A ligação definitiva entre o roedor e a FHBo foi realizada quando os roedores foram removidos em metade da cidade de San Joaquín, com o conseqüente desaparecimento da doença nesta região, cerca de duas semanas mais tarde, ao mesmo tempo em que os casos da FHBo continuaram sendo notificados na área sem remoção dos roedores (Kuns 1965, Mercado 1975).

A distribuição do roedor *C. callosus* inclui áreas secas e subúmidas do leste da Bolívia, norte da Argentina, Paraguai e no centro-oeste do Brasil (Nowak 1991). Independentemente do status taxonômico do gênero *Calomys*, estudos demonstram que as espécies de roedores reservatórios do MACV coletadas em Beni, possuem uma história evolutiva diferente, formando

uma linhagem monofilética independente das outras encontradas na América do Sul, o que poderia explicar por que essa doença só ocorre no nordeste da Bolívia e não em toda a extensão onde essa espécie de roedor é encontrada e confirma o elevado grau de especificidade de hospedeiro encontrado entre arenavírus e seus mamíferos reservatórios (Salazar-Bravo et al. 2002). Corroborando com esses dados, uma análise de sequências do Tfr1 de roedores identificou resíduos que parecem ter sido selecionados positivamente e esses resíduos estão localizados no domínio de Tfr1 que interage com a GP do vírus MAC. Essas mutações que ocorrem naturalmente são capazes de prevenir a ligação do MACV, mantendo a funcionalidade Tfr1 (Demogines et al. 2013). Fato que chama a atenção, pois a maioria das mutações que conferem proteção contra a infecção fazem isso com algum dano para o hospedeiro, devido à perda de funcionalidade da proteína. Estas variações são capazes de conferir proteção em roedores e variantes similares da infecção pelo MACV (Demogines et al. 2013).

Em estudos utilizando de colônias de *C. callosus* criados em laboratório, os animais infectados ao nascerem com o MACV permaneceram infectados durante toda a vida, com viremia e virúria persistentes, sem soroconversão. Esses animais também apresentaram uma diminuição da massa corporal e sua capacidade de reprodução foi reduzida em cerca de 95% (Justines & Johnson 1969, Webb et al. 1975a). Curiosamente, quando infectados na fase adulta, 50% dos animais foram capazes de eliminar a infecção enquanto a outra metade se manteve cronicamente infectada (Justines & Johnson 1969). Um achado interessante é que a maioria dos roedores *C. callosus* naturalmente infectados pelo vírus MAC apresentam esplenomegalia (Mercado 1975).

Roedores dos gêneros *Oryzomys* e *Proechimys* infectados experimentalmente desenvolveram anticorpos neutralizantes contra o MACV, sem sinais aparentes de doença ou de cronificação da infecção (Johnson et al. 1965). O mesmo não foi encontrado durante as pesquisas em pequenos mamíferos da região onde, além do roedor *C. callosus*, nenhum outro animal foi encontrado naturalmente infectado pelo MACV (Johnson et al. 1966). Tentativas de infectar outros animais como gatos, galinhas, porcos, marsupiais e cavalos também não resultaram em infecção aparente e anticorpos neutralizantes foram encontrados apenas em cavalos e gatos (Webb et al. 1967).

As atividades agrícolas dominam a economia do norte da Bolívia, onde muitos trabalhadores estão empregados na agricultura e pecuária (Kilgore et al. 1995). Trabalhadores

rurais residem por períodos prolongados em áreas rurais também habitadas por *C. callosus*, em casas de fazenda construídas com paredes parcialmente abertas que podem facilitar o acesso dos roedores ao domicílio. Assim, a exposição humana a roedores infectados podem ocorrer em torno de abrigos dos trabalhadores agrícolas ou durante o trabalho nos campos e pradarias da região onde a FHBo é endêmica (Mackenzie et al. 1964b, Kuns 1965, Kilgore et al. 1995).

Dentro dessa região os animais infectados com o MACV foram encontrados em partes das províncias de Itenez, Mamoré e Yacuma do departamento de Beni, na Bolívia. Assim, como um problema de saúde pública, o controle de *C. callosus* foi restrito a uma parte do departamento medindo cerca de 28.000 km² e habitado, na década de 1960, por cerca de 50.000 pessoas. A criação de gado e agricultura de subsistência eram, e ainda são, as principais ocupações da população residente nessa região. O transporte era feito por via fluvial, aéreo, a cavalo ou carro de bois. As quatro cidades onde a maioria dos casos ocorreram são: Magdalena, San Joaquín, San Ramon, e Santa Ana todas com populações entre 2000 e 5000 pessoas (Figura 1.8) (Kuns 1965).

No ano de 1964 a transmissão da FHBo diminuiu abruptamente, de uma média de 1,1 casos por dia para 0.24, após a implementação do controle dos roedores reservatórios no município de San Joaquín. Um total de 3.020 roedores (2.896 *C. callosus*) foram capturados, nas primeiras três semanas do programa, e muitos mais, morreram em decorrência do uso, pelos agentes de controle, de fosfato de zinco (Kuns 1965). Com o sucesso deste procedimento, um programa regular foi mantido no qual cada casa foi inspecionada com 15 armadilhas por três noites consecutivas de cada mês. Cerca de 80 roedores do gênero *Calomys* foram capturados por mês, de Agosto 1964 a Março de 1965 (Mercado 1975).

No início de 1965, 24 novos casos de FHBo ocorreram em San Joaquín, e todos foram fortemente correlacionados com as casas onde o maior número de roedores foram capturados. A maioria dessas casas estavam localizadas na área noroeste da cidade. A partir de março 1965 foram feitos intensos esforços para eliminar roedores nestas casas. O número de armadilhas triplicou, fosfato de zinco foi novamente utilizado por um curto período e cartolinas polvilhadas com talco foram colocados sob telhas curvas ao longo de potenciais caminhos de roedores e em torno das casas. Quando os agentes detectavam roedores do gênero *Calomys* que não foram capturados ou envenenados, expedições à noite eram realizadas, verdadeiras “caças” a esses animais, com armas de chumbinho (Mercado 1975).

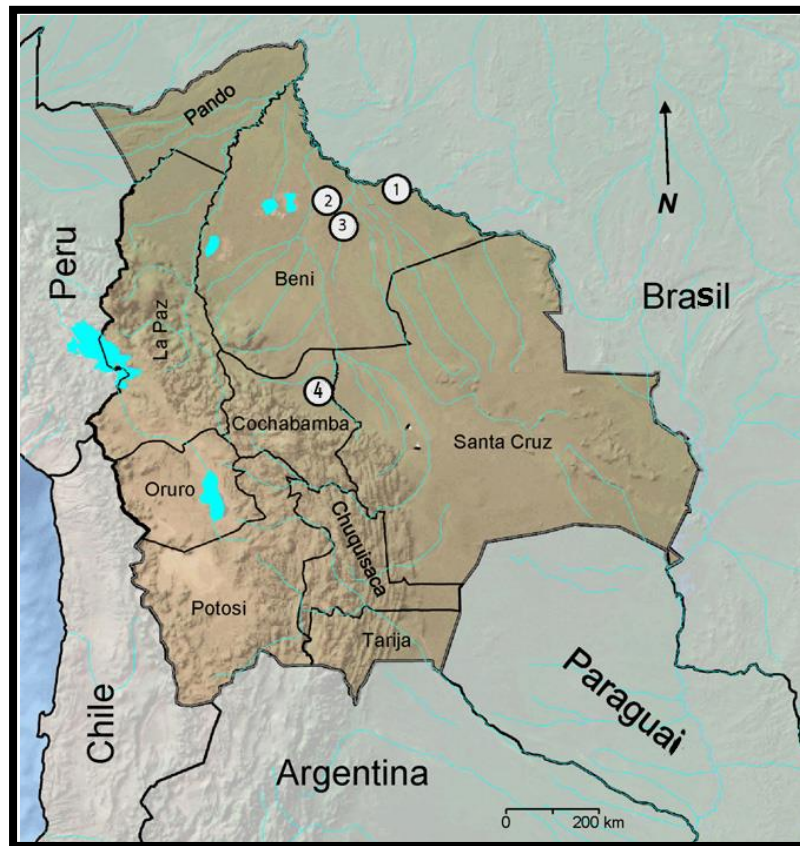


Figura 1.8. Mapa da Bolívia, os nove departamentos e as localidades (1) Magdalena (2) San Joaquín (3) San Ramón e (4) Chapare, onde ocorreram os casos de Febre hemorrágica boliviana (Adaptado de Cajimat et al. 2009).

O período de 1966 a 1968 representou uma fase de baixa atividade do MACV. Poucos roedores do gênero *Calomys* foram encontrados em San Joaquín e apenas dois possíveis casos, mas não comprovados, ocorreram. Em 1966, treze pacientes foram admitidos no hospital municipal, provenientes de quatro pequenas localidades ao sul da cidade. Oito deles eram da aldeia de Rio Negro (Anuário epidemiológico Boliviano, 2000). A maioria dessas pessoas negou ter tido uma doença grave num período prévio de um a dois meses. Um grande número de *C. callosus* foi capturado e mais de 30% dos animais testados apresentaram anticorpos específicos. Atividades de captura e envenenamento foram intensificadas nas regiões onde os casos ocorreram (Mercado 1975).

De 1966 a 1969 menos de 300 roedores *Calomys* foram capturados, provavelmente pelos seguintes fatos: (i) o principal e talvez o único reservatório natural do vírus Machupo seja o roedor *C. callosus*; (ii) *C. callosus* se adapta facilmente ao ambiente peridoméstico, com

capacidade de invadir casas e jardins, alcançando densidades populacionais nestas circunstâncias que nunca são observadas na ausência do homem; (iii) uma vez que as densidades *Calomys* foram intensamente reduzidas, através de capturas e envenenamento, as populações desse roedor foram, provavelmente, mantidas abaixo do limiar de infecção do vírus, necessária para a transmissão ao homem em uma cidade (Mercado 1975).

É importante mencionar que em San Joaquín, situado a cerca de uma milha do porto no rio Machupo, nenhum roedor da espécie *Rattus rattus* e pouquíssimos exemplares da espécie *Mus musculus* foram capturados. Mais do que 95% de todos os mamíferos capturados foram classificados taxonomicamente como *C. callosus* (Mercado 1975).

O ano de 1969 marcou o advento da segunda fase no desenvolvimento do programa de controle. Em janeiro e fevereiro de 1969, 10 casos de FHBo com seis mortes ocorreram na comunidade de La Cayoba, uma área de cultivo de arroz, 40km ao norte de Magdalena. Muitos fugiram da comunidade e as pessoas restantes foram transferidas para uma fazenda de propriedade do governo, a 5km de Magdalena. Acredita-se que Magdalena, ao contrário de San Joaquín, estava infestada de roedores da espécie *Mus musculus* (um fato descoberto em 1964 durante uma pesquisa realizada para determinar o motivo pelo qual só esta cidade não tinha epidemias de FHBo), fato que impediria a entrada dos roedores *C. callosus* (Kuns 1965, Mercado 1975). No entanto, a partir de março de 1969, a doença apareceu em Magdalena, com 22 casos naquele ano e 12 em 1970. Os casos ocorreram inicialmente em casas na periferia da cidade nos 24 blocos onde *C. callosus* foram predominantemente capturados enquanto *Mus musculus* eram muito mais numerosos nos 23 blocos internos. As autoridades responsáveis então decidiram adotar medidas de controle de base, liberando todos os roedores do gênero *Mus* e priorizando a captura apenas de *Calomys* (Mercado 1975).

O raciocínio era que o extermínio de *Mus musculus* poderia abrir o caminho para a penetração do *Calomys* para o centro da cidade. O rápido aumento de mais de uma espécie de roedores silvestres e o aparecimento de gambás nas periferias de Magdalena, durante a década de 1970, mostraram que a migração de outros animais para os limites da cidade representa um fenômeno recorrente (Mercado 1975). A ausência de epidemias de FHBo, nos anos seguintes, sugere que o controle de roedores focada em cidades da região endêmica impediu grandes surtos urbanos.

Em 1971 foi registrado o primeiro surto fora da área endêmica de FHBo, no departamento de Cochabamba localizado em áreas de maior altitude (aproximadamente 2,700 metros acima do nível do mar) onde não existe a descrição do roedor *C. callosus*. O caso índice foi uma estudante de enfermagem, com histórico de viagem para um rancho em Forteleza e para capital do país Trinidad (áreas não endêmicas), no departamento de Beni. Um total de cinco pessoas foram infectadas, incluindo dois familiares que acompanharam o caso índice e três profissionais de saúde, duas enfermeiras e um patologista. Apenas um dos infectados sobreviveu, após semanas de doença grave. Altas concentrações do vírus foram detectadas no sangue e secreções dos pacientes infectados. Outra característica interessante deste surto foi a presença de icterícia em quatro pacientes, o que não é comum na FHBo (Peters et al. 1971). Estudos posteriores, concluíram que, possivelmente, o vírus envolvido nesse surto de Cochabamba tenha sido uma variante do vírus MAC, com a capacidade de causar doença com características imunológicas e histopatológicas semelhantes à FHBo clássica (Terrell et al. 1973).

De 1975 a 1992 nenhum caso de FHBo foi notificado. Em março de 1993, um caso fatal foi registrado e em 1994, um surto foi identificado entre os membros de uma mesma família, residentes no município de Magdalena localizado no centro-norte da província de Itenez (Anuário epidemiológico Boliviano, 2000).

Durante o período de 4 de julho a 12 de agosto de 1994, sete membros da família, com idades entre 10 meses e 50 anos, desenvolveram uma doença caracterizada por febre, hipotensão, hemorragia subconjuntival e gengival, epistaxe, petéquias e tremores. Seis dos sete indivíduos infectados morreram e o caso índice foi o único sobrevivente. O diagnóstico de FHBo foi confirmado pelo isolamento do vírus MAC e pela detecção de antígenos virais em todos os cinco pacientes para os quais estavam disponíveis amostras. A captura de roedores na região, onde a provável exposição do caso índice a roedores infectados poderia ter ocorrido, resultou na captura de 84 roedores, apenas nove *C. callosus*, e nenhum roedor foi reativo para os testes realizados, demonstrando que a estratégia de controle de roedores implementada nas décadas anteriores ainda tinham efeito sobre a população de roedores daquela região. Após a identificação desse surto familiar, um caso adicional envolvendo uma técnica de laboratório foi notificado as autoridades sanitárias boliviana. Acredita-se que um tubo de ensaio contendo amostra sangue de um dos membros da família quebrou em uma centrífuga e expos uma técnica de laboratório de 37 anos de idade, em Santa Cruz. Em 11 dias a técnica desenvolveu uma doença febril aguda,

mas o quadro retrocedeu após administração de ribavirina endovenosa. No mesmo ano, mais dois casos, não relacionados ao surto familiar, foram diagnosticados no departamento de Beni (Aguilar et al. 2009). Acredita-se que o re-aparecimento da FHBo na década de 1990, tenha sido provocado pelas inundações que ocorreram em 1992 (Anuário Epidemiológico Boliviano, 2000) que provocaram a dispersão dos roedores reservatórios para novas áreas e a sua aglomeração em locais mais altos.

Nos anos seguintes, casos esporádicos de FHBo ocorreram na área endêmica da doença. De 2007 a 2008, mais de 200 casos suspeitos, dos quais 15 fatais, foram notificados ao serviço de saúde do departamento de Beni. Os casos confirmados eram em sua maioria homens com idades entre 19 e 46 anos, fazendeiros, provenientes das províncias de Itinez e Mamoré (Aguilar et al. 2009). A reemergência da FHBo nas décadas de 1990 e anos 2000, pode, em parte, ser explicada pela diminuição dos recursos alocados para o controle da FHBo devido à ausência de casos durante um período prolongado e também pelo aumento da demanda de outros problemas de saúde pública enfrentados pelo país como tuberculose, doença de Chagas e doenças sexualmente transmitidas (Kilgore et al. 1995). Outra explicação para este fato é que dado o crescimento econômico projetado para a Bolívia, é provável que o risco dos trabalhadores agrícolas para a exposição de *C. callosus* esteja aumentando à medida que o desenvolvimento modifica o habitat natural do roedor reservatório e aumenta a frequência do contato humano com estes animais (Kilgore et al. 1995).

Esforços para controlar a FHBo têm sido realizados com base na experiência da Argentina, onde o trabalho em curso levou ao controle da FHAr, causada pelo JUNV, um arenavírus geneticamente relacionado ao MACV (Cajimat et al. 2009). O uso de uma vacina eficaz contra FHAr apresenta evidências de proteção cruzada contra o vírus MAC (Kilgore et al. 1995, Buchmeier et al. 2007) o que sugere que a vacinação pode desempenhar um papel importante na prevenção de FHBo para as pessoas com maior risco, como os profissionais do programa de controle dos roedores reservatórios e trabalhadores agrícolas de áreas endêmicas.

O tratamento da FHBo é realizado através do suporte do paciente e da administração de plasma hiperimune e de ribavirina endovenosa. Assim, casos prováveis de FHBo podem se beneficiar do tratamento com plasma imune de outros casos de FHBo, se administrado logo após o início dos sintomas clínicos. A avaliação rigorosa da eficácia do plasma imune para a terapia de BHF tem sido limitada, em parte, pelo baixo número de doadores qualificados (Eddy et al.

1975, Villagra et al. 1994). Os anticorpos monoclonais, incluindo anticorpos monoclonais murinos humanizados, podem representar uma alternativa eficaz e segura para a terapia com plasma hiperimune. Obviamente, a fase inicial do desenvolvimento de anticorpos monoclonais para a terapia de FHBo deve incluir estudos para avaliar a capacidade dos anticorpos monoclonais individuais para neutralizar as diferentes variantes regionais de MACV e o potencial para o surgimento de mutantes de escape de neutralização *in vivo* (Cajimat et al. 2009, Radoshitzky et al. 2012).

1.3.4. Febre Hemorrágica Venezuelana

Em setembro de 1989, no estado de Portuguesa na Venezuela, um surto de uma doença hemorrágica febril grave foi reconhecido. Os pacientes eram em sua maioria agricultores provenientes do município de Guanarito e apresentavam um quadro clínico sugestivo de infecção viral, caracterizado por hemorragia e com manifestações neurológicas. Inicialmente, a maioria dos casos relacionados a esse surto foram diagnosticados como casos de dengue, já que em outubro do mesmo ano, o país enfrentava a sua primeira epidemia de dengue hemorrágica causada pelos sorotipos 1, 2 e 4, com predomínio do tipo 2 (Salas et al. 1991).

No ano seguinte, 1990, quando os casos de dengue diminuíram, foi possível perceber a manutenção dos casos no município de Guanarito que, semelhante a diversas áreas rurais do estado de Portuguesa, apresentava uma evolução demográfica com alterações ecológicas que resultaram no aumento significativo na frequência de contato entre seres humanos e roedores. Assim, ao mesmo tempo que a densidade da população humana em áreas rurais de Portuguesa aumentou de 7,6 para 14,3 pessoas/km² no período de 10 anos, que terminou em 1990, ocorreu o aumento da utilização de campos nativos e das áreas florestadas para fins agrícolas (Tesh et al. 1993, Fulhorst et al. 1999, 2008).

Em 1991, Salas e colaboradores descreveram os primeiros casos de uma nova febre hemorrágica, a febre hemorrágica venezuelana (FHV), muito semelhante a outras febres hemorrágicas americanas, causadas por arenavírus, já conhecidas no continente americano. O agente etiológico da FHV, o vírus Guanarito (GTOV), membro do sorocomplexo Tacaribe, foi isolado de dois casos fatais ocorridos em 1990 (Tesh et al. 1994). Nos anos subsequentes, estudos eco-epidemiológicos realizados nas áreas endêmicas de FHV, apontaram os roedores das

espécies *Sigmodon alstoni* e *Zygodontomys brevicauda* como os potenciais reservatórios do GTOV (Tesh et al. 1993). Hoje sabe-se que o principal reservatório do GTOV é o roedor *Z. brevicauda* (Fulhorst et al. 1999).

A espécie *Z. brevicauda* (Figura 1.9), o rato da cana-de-açúcar, é um dos roedores mais abundante na região de planícies (*llanos*) central onde a FHV é endêmica. Este roedor está distribuído do litoral do pacífico ao oeste da Costa Rica, cruzando o Panamá, a Colômbia, a Venezuela, as Guianas e a região norte do Brasil (Voss 1991, Manzione et al. 1995, Bonvicino et al. 2008). Esta espécie de roedor especialista, que prefere coberturas herbáceas densas e arbóreas esparsas, habita campinaranas e campos de altitudes nas savanas (Cerrado) da floresta Amazônica e campos agrícolas. Voss (1991) descreve a espécie *Z. brevicauda* como um roedor oportunista que coloniza ambientes antropogênicos constituídos por vegetação invasiva. Esses roedores apresentam hábitos noturnos, estritamente terrestres, aparentemente onívoros e que se reproduzem durante todo o ano (Utrera & Duno 2007).



Figura 1.9. Roedor reservatório do vírus Guanarito: *Zygodontomys brevicauda* (Foto cedida por Cibele Rodrigues Bonvicino).

Um grande estudo realizado com roedores da Venezuela encontrou uma alta prevalência de *Z. brevicauda* em plantações de milho, sorgo, algodão e em vegetações das bordas destes plantios. A densidade da população deste roedor apresenta flutuações sazonais típicas, com um aumento durante a estação seca, atingindo níveis máximos no final da temporada, diminuindo durante a estação chuvosa com o desaparecimento quase total. A densidade populacional apresenta flutuações cíclicas significativas atingindo máxima densidade populacional a cada

quatro ou cinco anos, que se correlacionam com os ciclos endêmicos e epidêmicos de FHV (Tesh et al. 1993, Manzione et al. 1995, Fulhorst et al. 1999, Utrera et al. 2000, Utrera & Duno 2007).

Acredita-se que GTOV pode estabelecer uma infecção crônica (ao longo da vida) no seu reservatório e que os animais cronicamente infectados excretam partículas virais infecciosas pela via urinária e em secreções de orofaringe (Tesh et al. 1993, Fulhorst et al. 1997). Os resultados de estudos de infecção experimental sugerem que a capacidade do GTOV para estabelecer o estado de portador crônico é dependente da idade do animal no início da infecção. Animais mais novos parecem incapazes de realizarem o *clearance* do vírus, enquanto alguns dos animais adultos infectados, sob as mesmas condições, foram capazes de eliminar a infecção (Fulhorst et al. 1999). No mesmo estudo, nem letalidade ou doença foram associadas com a infecção crônica do roedor, sugerindo que a longevidade dos roedores cronicamente infectados, provavelmente, seja comparável à dos homólogos não infectados, apesar de ainda ser necessário determinar se a infecção crônica pode afetar outros parâmetros de aptidão do hospedeiro, como por exemplo, taxa de crescimento e a fecundidade (Fulhorst et al. 1999).

A transmissão do GTOV entre os roedores parece ocorrer principalmente por via respiratório (inalação de aerossóis), por mecanismos comportamentais, acasalamento, agressão intra-espécie, entre outras atividades que envolvem contato físico (Milazzo et al. 2011). A falta de uma associação entre a incidência da infecção e sexo dos roedores na fase adulta sugere que os machos e as fêmeas contribuem igualmente para a transmissão do GTOV entre os roedores da espécie *Z. brevicauda*. A alta prevalência de infecção nas fêmeas adultas, juntamente com uma baixa prevalência de infecção nos roedores mais jovens, levam a crer que a transmissão vertical de GTOV entre *Z. brevicauda* seja incomum (Tesh et al. 1993, Fulhorst et al. 1999, Milazzo et al. 2011).

Outras espécies de roedores presentes na região de planícies na Venezuela suscetíveis à infecção pelo vírus da Guanarito são: *Sigmodon alstoni*, *Oligoryzomys fulvescens* e *Oryzomys* spp. (Salas et al. 1991, Weaver et al. 2000, Milazzo et al. 2011). Apesar de aparentemente suscetíveis, acredita-se que estes roedores sejam hospedeiros finais, portanto, possuem importância limitada na manutenção do ciclo enzoótico do GTOV na região. Estes casos de *spillover* foram associados, embora considerados eventos raros e incomuns, às interações sociais íntimas entre o roedor reservatório *Z. brevicauda* e outras espécies de roedores (Fulhorst et al. 1999, Milazzo et al. 2011).

A presença de roedores infectados pelo GTOV foi identificada nos estados de Apure, Barinas, Cojedes, Guárico e Portuguesa, o que indica que GTOV já circulava na forma enzoótica muito antes de 1989 (Fulhorst et al. 2008). Até o momento, todos os casos prováveis e confirmados de FHV têm ocorrido entre as pessoas que residem nas porções sul e sudoeste do estado Portuguesa, regiões adjacentes do estado Barinas e a região centro-oeste do estado de Guarico (Figura 1.9) ou que visitaram recentemente essas áreas da Venezuela. A distribuição focal da doença e seu padrão geográfico de infecção não mudaram durante os últimos anos (Salas et al. 1991, de Manzione et al. 1998).

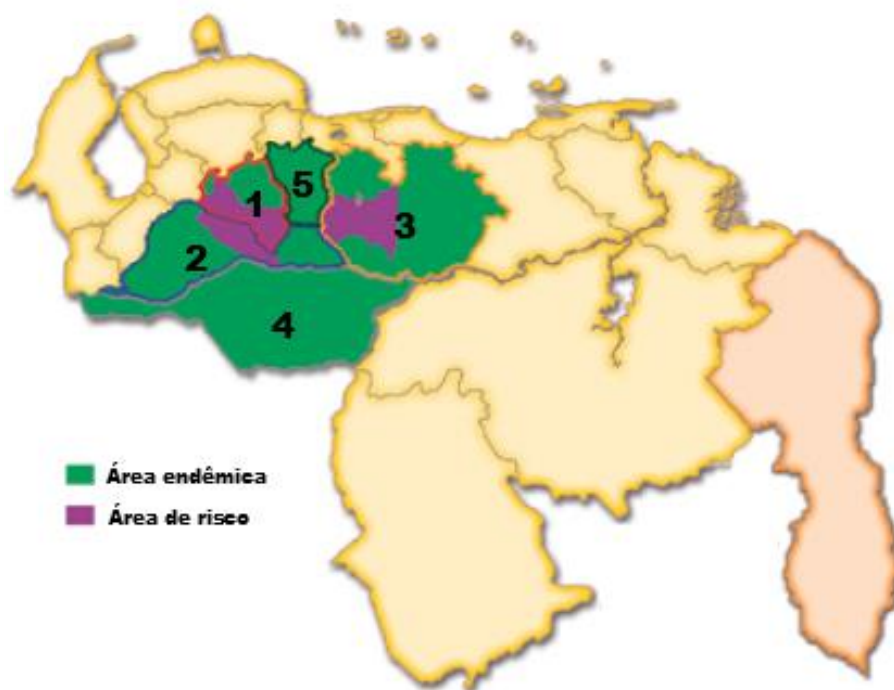


Figura 1.10. Mapa da Venezuela destacando as áreas de risco para infecção pelo vírus Guanarito. A numeração se refere aos estados de: (1) Portuguesa; (2) Barinas; (3) Guarico; (4) Apure e (5) Cojedes. (Adaptado de Vargas 2013)

A área reconhecida como endêmica de FHV ocupa mais de 9,000 km². A população humana da região endêmica FHV no estado de Portuguesa é de aproximadamente 300.000 habitantes, com aproximadamente 150 mil pessoas que vivem em Guanare, capital do estado, e outros 8.000 vivem na cidade de Guanarito. O restante da população (aproximadamente 142,000) vivem em áreas rurais, a maioria envolvidas na agricultura e/ou pecuária. No entanto, muitos dos

moradores de Guanare e Guanarito possuem ou trabalham em fazendas em regiões rurais do estado, podendo entrar em contato com roedores reservatórios do GOTV (Tesh et al. 1993). As principais plantações da região são o milho, sorgo, algodão, arroz, girassol, cana-de-açúcar, melões e feijão. Durante as épocas de plantio e colheita, um grande número de trabalhadores agrícolas temporários, oriundos de áreas próximas da Venezuela e da Colômbia, migram para região (de Manzione et al. 1998).

Desde setembro de 1989 até dezembro 2010, mais de 728 casos de FHV foram identificados com uma taxa de letalidade de 23,1% (Vargas 2013). A FHV é endêmica, com casos que ocorrem durante todo o ano, com uma tendência sazonal definida, com mais da metade (53%) dos casos ocorrendo entre os meses de novembro e janeiro. Este período de três meses está relacionado com o fim das chuvas e início da estação seca, um tempo de intensa atividade agropecuária na região, quando ocorre a colheita das plantações e a terra é subsequentemente desmatada para ser utilizada no próximo plantio. Conseqüentemente, ocorre um maior contato humano com o solo e com roedores potencialmente infectados durante esse período do que em outras épocas do ano (Vainrub & Salas 1994a, de Manzione et al. 1998).

Segundo dados de incidência da FHV, depois que a doença foi descrita, até agosto de 1992, durante o período de 35 meses, foi possível verificar que existem períodos cíclicos, de forma continuada, da atividade da doença numa escala de vários anos. De setembro de 1992 a agosto de 1996 houve uma diminuição do número de casos, quando apenas nove casos ocorreram durante este segundo período (36 meses). No entanto, a partir de setembro de 1996, a incidência mensal da FHV aumentou novamente com ocorrência de casos durante o mês de maio de 1997 (de Manzione et al. 1998). Após um novo surto que se iniciou em 2001 e que culminou com 301 casos durante o período de 2001 a 2003, a doença tem se mantido com o número de casos reduzidos e com alguns pequenos surtos esporádicos (Vargas 2013).

Como observado anteriormente, a maioria da população residente nas áreas endêmicas de FHV está envolvida com algum tipo de atividade agrícola. A maioria dos indivíduos acometidos é do sexo masculino, cuja ocupação está relacionada com a agricultura, enquanto as mulheres são, em sua maioria, donas de casa. Essa diferença presumida pela exposição ocupacional aos roedores potencialmente infectados pode explicar em parte a preponderância do sexo masculino entre os casos de FHV. Por outro lado, as mulheres que vivem em áreas rurais da região, muitas vezes trabalham nos campos durante a época de colheita - por exemplo,

colhendo algodão-, de modo que elas têm alguma exposição aos roedores potencialmente infectados (Salas et al. 1991, de Manzione et al. 1998).

Assim, sob o ponto de vista clínico-epidemiológico, a FHV acomete predominantemente homens, adultos com idade média de 27,6 anos e os quadros clínicos não são diferentes das descrições clínicas das outras febres hemorrágicas por arnavírus americanos. Da mesma forma, os resultados hematológicos iniciais nos casos de FHV são semelhantes, sendo a trombocitopenia o achado hematológico mais consistente. A contagem inicial de plaquetas parece não ter nenhuma relação com o desfecho do caso. Em contraste, nos pacientes que chegam aos hospitais com convulsões ativas ou história de convulsões recentes, o prognóstico geralmente é ruim. Nenhuma terapia antiviral específica foi dada a nenhum dos pacientes com FHV. O tratamento varia consideravelmente, dependendo do estado clínico dos pacientes (de Manzione et al. 1998). Os pacientes que se recuperam, geralmente, não possuem sequelas, apesar dos relatos de perda da audição e alopecia (Salas et al. 1991).

Quanto às medidas de prevenção, a eliminação da grama alta e outras vegetações nas proximidades das habitações humanas e áreas de trabalho, por exemplo, campos cultivados, para controlar FHV também pode auxiliar na prevenção da infecção pelo GTOV em seres humanos (Fulhorst et al. 1999).

1.3.5. Febre Hemorrágica Brasileira

A febre hemorrágica brasileira (FHBr) foi descrita na década de 1990, no estado de São Paulo. Até o momento, apenas três casos foram registrados, uma infecção natural e duas infecções laboratoriais subsequentes no Brasil e nos Estados Unidos. O caso índice foi uma engenheira agrônoma de 25 anos que procurou assistência médica no dia 12 de janeiro 1990, após 12 dias de febre, cefaleia, mialgia, náuseas, vômitos e fraqueza. Com um quadro de sonolência associado a desidratação e hiperemia de orofaringe, os exames laboratoriais realizados indicavam leucopenia e níveis de aspartato aminotransferase ligeiramente elevados (Coimbra et al. 1994).

A história epidemiológica da paciente não apresentava nenhum fato que chamasse atenção. Ela trabalhava em um escritório, na cidade de São Paulo e não tinha viajado para fora do estado nos dois meses antes de adoecer. Dez dias antes do início dos sintomas, ela viajou com

família e amigos para o interior do estado. Com as hipóteses diagnósticas de sepse, leptospirose, malária, hepatite e febre amarela, foi iniciado tratamento de suporte e antimicrobiano empírico. No entanto, no terceiro dia de internação, o quadro da paciente se agravou com o surgimento de hematêmese, hemorragia vaginal e petéquias conjuntivais. O quadro neurológico evoluiu com aumento da sonolência, surgimento de tremores, dificuldade em andar e convulsões generalizadas, culminando com coma e choque, sem resposta ao tratamento. A morte ocorreu no quarto dia de internação. Os principais achados da necropsia foram edema pulmonar difuso e congestão com hemorragias intraparenquimatosas associada à congestão hepática com hemorragia e necrose focal, além de edema renal e necrose tubular aguda, aumento e congestionamento do baço e hemorragia gastrointestinal maciça (Coimbra et al. 1994).

A amostra de sangue coletada pouco antes da morte foi encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz, onde foi inoculada por via intracerebral em camundongos recém-nascidos. Um agente foi isolado a partir de cérebros de camundongos doentes e convalescentes. O agente detectado não reagiu com soros imunes preparados para os vírus humanos patogênicos comumente encontradas no Brasil. As amostras foram então encaminhadas para o Instituto Evandro Chagas em Belém e, em seguida, para a Unidade de Pesquisa de Arbovírus em Yale e para o Instituto de Pesquisa Médica de Doenças Infecciosas do Exército dos EUA. Testes imunológicos e virológicos comprovaram que se tratava de um novo vírus, pertencente à família *Arenaviridae* (gênero: *Arenavirus*). Este novo agente foi nomeado vírus Sabiá (SABV), o nome do bairro (Jardim Sabiá) do município de Cotia, onde a paciente estava hospedada quando adoeceu. A fonte de infecção ainda é desconhecida, mas parece provável que o vírus Sabiá seja mantido na natureza em reservatório roedor silvestre, ainda não identificado (Coimbra et al. 1994, Gonzalez et al. 1996).

Durante a caracterização do vírus, em Belém, em junho de 1992, o segundo caso foi identificado em um técnico de laboratório, de 39 anos de idade, que foi infectado provavelmente por inalação de aerossol. O profissional foi infectado acidentalmente, três semanas antes do início do quadro clínico, durante a passagem do vírus para preparação de antígeno utilizando cérebros de camundongos recém-nascidos infectados com amostras de sangue do caso índice. O profissional apresentou doença grave com febre alta (38-40°C), calafrios, mal-estar, cefaléia, mialgia generalizada, odinofagia, conjuntivite, náuseas, vômitos, diarreia, dor epigástrica, ulcerações da mucosa oral e sangramento discreto das gengivas, ao realizar higiene bucal, por 15

dias. Sem outra manifestação neurológica que não tenha sido a cefaleia, os resultados dos exames laboratoriais do paciente mostraram leucopenia e linfocitose gradativas à medida que a doença evoluía. A administração de fluidos intravenosos foi necessária e o paciente se recuperou. A soroconversão para SABV foi demonstrada em soros pareados das fases aguda e convalescente, por diferentes testes sorológicos (Vasconcelos et al. 1993, Coimbra et al. 1994).

O segundo incidente envolvendo uma exposição humana ao SABV, ocorreu na Universidade de Yale na Unidade de Pesquisa de Arbovírus, em 8 de agosto de 1994. Um virologista de 46 anos foi exposto ao vírus quando purificava um grande volume de fluido de cultura de tecidos. A avaliação do paciente possibilitou sugerir que a exposição ocorreu durante a utilização de uma centrífuga enquanto ele trabalhava sozinho em um laboratório de nível de biossegurança 3. O equipamento continha seis frascos de polycarbonato com tampa de rosca com cerca de 200 ml de fluido de cultura de tecidos. Ao abrir a tampa do rotor para remover os frascos da centrífuga, ele observou que a parte externa de um dos frascos estava molhada e que o fluido havia vazado para o fundo do rotor. Nenhuma ruptura óbvia foi identificada no momento, e o virologista usava, no momento, uma máscara cirúrgica, um jaleco descartável e luvas. O profissional não possuía escoriações ou arranhões em suas mãos e usou um segundo par de luvas durante a descontaminação do rotor com solução concentrada de hipoclorito de sódio, mas não usou um respirador purificador de ar de pressão positiva, apesar de estar disponível. (Barry et al. 1995, Gonzalez et al. 1996).

Em 16 de agosto de 1994, oito dias após o incidente no laboratório, o virologista observou mialgias, uma leve dor de cabeça, rigidez no pescoço e febre, associados com hiperemia conjuntival e leve aumento dos linfonodos cervicais. Ele foi internado imediatamente após os clínicos relacionarem o incidente da centrífuga com uma possível infecção ocupacional ao SABV e iniciaram o tratamento com ribavirina intravenosa na dose utilizada pelos Centros de Controle de Doenças e Prevenção (CDC) para outras infecções por arenavírus - uma dose de ataque de 30mg por quilograma de peso corporal, seguida por uma dose de 15mg por quilograma cada seis horas durante quatro dias, e, em seguida, por uma dose de 7,5mg por quilograma três vezes ao dia durante seis dias. Após a confirmação, por PCR, da infecção pelo SABV, o paciente foi transferido para um quarto de isolamento de pressão negativa e só foi liberado depois da recuperação do paciente duas semanas após o início do quadro clínico. Todos os contatos do paciente foram identificados e estratificados em grupos risco. Foram identificados 139 contatos,

consistindo de trabalhadores que prestaram assistência ao paciente, técnicos do laboratório do hospital, os colegas, amigos e membros da família. Todos os contactantes foram incluídos em um programa de vigilância médica, que consistiu em uma coleta de sangue pra realização de testes sorológicos e preenchimento de questionário epidemiológico, na data do ocorrido e seis semanas depois. Nenhum dos indivíduos apresentou quadro ou exames que comprovassem infecção pelo SABV (Barry et al. 1995).

1.3.6. Febre Hemorrágica na Bolívia – Vírus Chapare

No final do ano de 2003, um pequeno surto de casos de febre hemorrágica em uma área rural próxima ao rio Chapare, no departamento de Cochabamba, na Bolívia, no leste dos Andes (Figura 6) foi identificado pelo Ministério da Saúde da Bolívia. Os detalhes exatos, assim como o número de casos e os sintomas apresentados, são poucos e confusos. No entanto, existe a descrição de um caso fatal envolvido, neste surto, de um homem de 22 anos, alfaiate e fazendeiro, morador de uma pequena cidade, Samuzabeti, localizada a 35 km a nordeste da Villa Tunari. Ele não possuía histórico de viagem e nem contato com qualquer caso de doença compatível por pelo menos quatro semanas antes do início da doença no dia 3 de janeiro de 2004. Além disso, nenhum membro da família ou outros contatantes próximos apresentaram manifestações clínicas semelhantes (Delgado et al. 2008).

Com um quadro clínico inicial caracterizado por febre, cefaleia, artralgia, mialgia e vômitos, o paciente evoluiu para um quadro hemorrágico que culminou em óbito 14 dias após o início da febre. Com base nas manifestações clínicas, a suspeita inicial foi de febre amarela ou dengue hemorrágico. Como os testes iniciais para estes agentes foram negativos assim como a análise sorológica e molecular para o vírus MAC ou arenavírus relacionados (Delgado et al. 2008), amostras de soro de fase aguda do paciente foram enviadas para o laboratório NB-4 da divisão especial de contenção de patógenos em Atlanta para a identificação do agente etiológico. No isolamento em células Vero E6 foi identificado um vírus não citopático. Uma reação cruzada com o soro hiperimune de arenavírus causadores de FHA foi identificada por imunofluorescência. A análise molecular do RNA do vírus isolado apresentou sequências nucleotídicas relacionadas aos arenavírus da Clade B do NM. O novo vírus foi denominado Chapare, o terceiro arenavírus detectado na Bolívia (junto com os vírus Machupo e Latino). Através de análises das sequências nucleotídicas, notou-se que o Chapare é estritamente

relacionado com o SABV. A relação desse novo vírus boliviano como vírus SABV do Brasil é intrigante. Ambos causam febres hemorrágicas semelhantes às causadas pelos vírus JUN, MAC e GTO, com uma forte associação com a extensa necrose hepática. O envolvimento mais amplo do fígado pode ser uma característica comum entre esses dois vírus, já que esse tipo de comprometimento não é comumente observado nas demais FHA causadas pelos outros arenavírus do NM. Assim como no caso do SABV, ainda não foi possível identificar o reservatório deste vírus (Delgado et al. 2008, Cajimat et al. 2009).

1.4. Arenaviroses e o Risco Ocupacional

Embora, de uma forma geral, praticamente não existam estudos sobre a incidência de infecção por arenavírus entre profissionais que atendem pacientes, que executam procedimentos laboratoriais com manuseio de amostras biológicas contendo o agente viral ou que manuseiam vertebrados silvestres, em especial, durante as atividades de campo, como mastozoólogos, biólogos e veterinários, entre outros profissionais, diversos relatos de infecções ocupacionais por arenavirus têm sido registrados. A maioria destes registros ocorrem nos hospitais, com acometimento de trabalhadores que participam diretamente do atendimento dos casos de arenaviroses ou durante a manipulação de amostra biológica, na maioria das vezes, como consequência do não cumprimento das medidas de biossegurança preconizadas (Macher & Wolfe 2006, Ajayi et al. 2013).

Assim, são as infecções hospitalares causadas pelo LASV que foram muito bem descritas na África, onde surtos de grande impacto na saúde pública, com repercussão na mídia, foram identificados em instituições de saúde com condições precárias de infraestrutura e de biossegurança. Na década de 1979, por exemplo, surtos hospitalares da febre de Lassa foram reconhecidos na Libéria e na Serra Leoa (Monath et al. 1973, Fraser et al. 1974).

Outro vírus africano que pode ser considerando um bom exemplo de risco ocupacional é o vírus Lujó, recentemente identificado como agente de febre hemorrágica viral no continente africano. Responsável pela transmissão nosocomial de uma infecção de elevada letalidade (80%), este novo arenavírus acometeu três profissionais de saúde e uma profissional de limpeza de um hospital da África do Sul (Briese et al. 2009).

Em relação ao LCMV, um levantamento realizado em 2011 demonstrou que 95% dos casos de infecção por este arenavírus em trabalhadores do hospital e de laboratório de pesquisa

ocorreu por inalação de aerossóis, reforçando a importância e a necessidade de atendimento às normas de biossegurança (Pedrosa & Cardoso 2011).

No continente americano, descrição de surtos semelhantes ocorreram na Bolívia, no surto de FHBo em Cochabamba, quando dois familiares e três profissionais que tiveram contato com os pacientes adoeceram (Peters et al. 1974).

Além dos profissionais de saúde que cuidam dos pacientes, acidentes laboratoriais têm sido relatados ao longo dos anos, não somente com LASV, mas também com os arenavírus SABV, MACV, Flexal e Taribe. A maioria dos indivíduos infectados se recupera depois de viver dias até semanas de doença grave (Buchmeier et al. 1974).

Por fim, como os arenavírus são mantidos na natureza pela infecção crônica de roedores reservatórios e que são transmitidos ao homem, principalmente, através da inalação de partículas virais presentes nos aerossóis formados a partir de excretas e secreções de roedores, principalmente da urina, profissionais que exercem atividades, nas quais ocorra contato direto ou indireto com estes roedores, devem ser considerados grupo de alto risco. Assim, apesar de escassa, na literatura infecções por vírus de origem zoonótica têm sido relatadas, embora raramente, em situações onde o homem entra em contato com os roedores, como em atividades de caráter profissional, tais como engenheiros agrônomos, veterinários, geólogos, biólogos, mastozoólogos, trabalhadores de áreas de desmatamento e de regiões de reflorestamento (Ferreira 2003, Fulhorst et al. 2007).

2. JUSTIFICATIVA

As febres hemorrágicas americanas (FHA) são doenças com altas taxas de letalidade (15 - 30%) e com grande impacto na saúde pública (Ambrosio et al. 2011). Essas doenças vêm sendo identificadas na América do Sul desde 1959 (Arribalzaga 1955) e algumas delas têm como característica a reemergência após um longo período de silêncio epidemiológico, como ocorreu com o vírus GTO na Venezuela e o vírus MACV na Bolívia (de Manzione et al. 1998, Aguilar et al. 2009).

No Brasil, após a identificação do primeiro e único caso de FHB, em 1990, nenhum estudo até o momento conseguiu identificar o possível reservatório do SABV (Coimbra et al. 1994). Em nosso país cinco espécies de arenavirus já foram descritas nos últimos anos em diferentes biomas e regiões. Além disso, o Brasil faz fronteira com três países onde as FHA são endêmicas - Argentina, Bolívia e Venezuela -, tornando factível a introdução de arenavirus exóticos em nosso território.

Dentro deste contexto, podemos destacar como potencial área de risco para emergência ou reemergência de febres hemorrágicas por arenavirus no Brasil, o estado do Mato Grosso do Sul, que apesar de não possuir casos de FHA, faz fronteira com a Bolívia e com estado de São Paulo, onde o único caso de FHBr foi notificado. A vigilância nesta localidade deve ser orientada não apenas para identificação de casos suspeitos, mas para circulação de arenavirus em roedores silvestres e a avaliação da soroconversão entre indivíduos de populações de alto risco para infecções zoonóticas.

Considerando a escassez de informações sobre arenavirus no país, estudos de soroprevalência em diferentes populações podem servir como ferramentas, importantes, para o entendimento da dinâmica dessa doença em nosso território. Populações de alto risco para exposição a esses vírus como biólogos, laboratoristas, profissionais de campo e mastozoólogos podem ser bons indicadores de circulação desses vírus e podem apontar para possíveis áreas ou mesmo situações onde infecções por arenavirus podem estar ocorrendo.

Outro ponto que merece destaque nas arenaviroses é a dificuldade na identificação de casos da doença que não são diagnosticados, em decorrência da similaridade clínica e laboratorial com um grande número de doenças endêmicas no Brasil como dengue, febre

amarela e malária. Esta dificuldade no diagnóstico diferencial foi vivenciada na Venezuela, onde inicialmente, a maioria dos casos de FHV causada pelo GUAV foi diagnosticada como dengue (clássico ou hemorrágico), já que no mesmo ano, o país teve a sua primeira epidemia de dengue hemorrágico pelos sorotipos 1, 2 e 4 (Salas et al. 1991).

Desta forma, este trabalho se propõe a contribuir com o conhecimento sobre esses vírus no estado do Mato Grosso do Sul e em populações consideradas de alto risco de diversas regiões do país. Os resultados obtidos, além do preenchimento desta lacuna do conhecimento, poderão subsidiar medidas para o diagnóstico, prevenção destas zoonoses e fornecer orientações para profissionais de saúde, para vigilância epidemiológica, secretarias de saúde e as demais entidades envolvidas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Identificar a presença de infecção por arenavírus em profissionais de saúde que manuseiam animais vertebrados e avaliar a circulação de arenavírus em humanos e roedores silvestres de diferentes regiões do Mato Grosso do Sul.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Realizar inquérito sorológico em amostras de soro de profissionais de saúde que manuseiam animais vertebrados

- Analisar amostras de soro de profissionais de saúde que manuseiam animais vertebrados, através do ELISA IgG;
- Avaliar aspectos epidemiológicos relacionados às atividades realizadas pelos profissionais sororeativos.

3.2.2 . Identificar infecções por arenavírus em amostras de pacientes com suspeita de dengue, com ou sem confirmação laboratorial, provenientes do estado do Mato Grosso do Sul

- Pesquisar através de RT-PCR, a presença do genoma viral em amostras soro/plasma;
- Sequenciar os produtos de PCR procedentes dos pacientes infectados por arenavírus;
- Verificar, pela técnica ELISA IgG, a presença de anticorpos anti-arenavírus em amostras de soro;
- Avaliar aspectos epidemiológicos, clínicos, laboratoriais dos casos confirmados.

3.2.3. Diagnóstico molecular da infecção por arenavírus em roedores do estado do Mato Grosso do Sul

- Detectar, através da técnica de RT-PCR, a presença do genoma viral em amostras de vísceras e/ou soro dos roedores coletados em diferentes municípios do estado;
- Sequenciar os produtos de PCR procedentes de amostras de roedores silvestres infectados por arenavírus;
- Sequenciar o segmento S genômico completo de exemplares das espécies virais identificadas;
- Realizar análises filogenéticas a partir das sequências nucleotídicas obtidas de arenavírus de Mato Grosso do Sul para comparação com as sequências de outros arenavírus já publicadas e disponíveis no GenBank.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho de estudo

O presente estudo foi desenvolvido com amostras humanas e de roedores silvestres no estado de Mato Grosso do Sul. O estudo com amostras humanas foi constituído por dois distintos grupos: (i) amostras de profissionais de saúde, de diversas regiões do Brasil, que exercem atividades nas quais existe o contato com animais silvestres, com o objetivo de inferir as regiões do país onde esses vírus possam estar circulando; (ii) amostras de soro de casos suspeitos e confirmados de dengue provenientes do Mato Grosso do Sul, cedidos pelo Laboratório de Imunologia Viral (LIV) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), com o objetivo de verificar a presença de infecção ou co-infecção por arenavírus.

O estudo com roedores silvestres foi realizado em amostras de sangue e de vísceras de animais capturados durante o desenvolvimento do projeto intitulado “*Deteção e caracterização de hantavírus em roedores silvestres capturados em áreas de ocorrência da Síndrome Pulmonar por Hantavírus e em áreas sem relato de casos no Brasil*”, em três municípios do estado de Mato Grosso do Sul que se encontravam acondicionadas no Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses (LHR), IOC, FIOCRUZ.

4.2. Amostras humanas

4.2.1. Profissionais de saúde que manuseiam animais

O estudo contou com a participação de 292 profissionais e estudantes que participavam do VI Congresso Brasileiro de Mastozoologia, realizado entre 18 e 22 de Agosto de 2008 na cidade de São Lourenço, MG. A participação foi voluntária e implicou no autopreenchimento de um questionário epidemiológico (Anexo 10.1) e coleta de sangue venoso para pesquisa de anticorpos séricos, após a assinatura do termo consentimento livre e esclarecido – TCLE (Anexo 10.2).

No questionário foram abordadas questões sobre a atividade profissional dos participantes, tempo, local e tipo de contato com animais, a utilização de EPIs (equipamentos de proteção individual) e dados vacinais. Como se tratava de um congresso nacional, o estudo englobou indivíduos de diferentes localidades e instituições brasileiras.

4.2.1.1. Coleta de material biológico dos profissionais de saúde

Cerca de 10 mL de sangue venoso periférico foram coletados em tubo de vácuo (vacutainer), sem anticoagulante. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 3000rpm por 5 minutos e o soro acondicionado em congeladores à -20°C para posterior análise. Todos os tubos foram identificados com o número de registro presente no questionário.

4.2.1.2. Teste sorológico

As amostras de soro foram encaminhadas para o LHR, onde o soro foi separado em alíquotas para a realização de testes sorológicos para pesquisa de diferentes agravos. A pesquisa de anticorpos da classe IgG anti-arenavírus foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido no *Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Julio I. Maiztegui”* como segue abaixo descrito:

Para a cobertura da placa com os antígenos, a seguinte divisão foi realizada: na parte superior da placa foi adicionado o do vírus Junín inativado (Cepa XJC13) diluído em PBS pH 7,4; na parte inferior foi adicionado o antígeno negativo (Células Vero não infectadas C76#37) no mesmo tampão. Após diluição dos antígenos e adição destes na placa, a mesma foi incubada em câmara úmida até o dia seguinte.

No dia seguinte, a placa foi lavada por cinco vezes com tampão PBS pH 7,4 acrescido de Tween a 0,1% (PBST). Os soros foram diluídos em tampão PBST contendo 5% de leite em pó desnatado. As diluições dos soros testes para *screening* foram de 1:100 diluição do *pool* de soros positivos (controle positivo) e *pool* de soros negativos (controles negativos) foram adicionados à placa nas diluições seriadas de 1:100, 1:400, 1:600 1:800 e 1:1000.

As amostras de soro foram adicionados em diluições únicas nos poços contendo o antígeno positivo e repetidos na mesma distribuição nos poços contendo o antígeno negativo, com volume final de 100µl. Após a adição dos soros à placa, esta foi incubada por uma hora a 37°C em câmara úmida. Após o termino de incubação, foi feita a lavagem por cinco vezes e, em seguida, adicionado o conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase, *Anti-human IgG gama* específico (KPL, EUA), em uma diluição de 1:2500 em PBST contendo LPD 5% e adicionado da mesma forma 100µl/orifício.

Posteriormente, a placa foi incubada por uma hora e ao término deste período, uma última lavagem de cinco vezes com PBST foi realizada, antes da adição do substrato. O substrato ABTS foi misturado na proporção 1:1 com peróxido de hidrogênio, e imediatamente distribuído na placa em volume de 50µl/orifício. Após a adição do substrato em toda a placa, a mesma permaneceu por 30 minutos em estufa a 37°C. A leitura da absorbância foi efetuada em 450 nm em espectrofotômetro.

As densidades óticas (DOs) obtidas com soros reagindo frente ao antígeno Junín foram subtraídas dos valores das DOs obtidas com os mesmos soros reagindo frente ao antígeno negativo, obtendo-se assim a DO líquida. O ponto de corte foi determinado a partir das médias das replicatas para cada diluição do *pool* de soros negativos (DO líquidas), acrescida de 3 desvios padrão. Foram considerados positivos, os soros em teste cujas DOs líquidas foram maiores que o valor do ponto de corte. O valor de corte (cut off) considerado foi $\geq 0,2$.

4.2.2. Amostras de pacientes com suspeita de dengue do estado do Mato Grosso do Sul

Frente ao completo desconhecimento das arenavirose no estado do Mato Grosso e no país como um todo, considerando a semelhança clínica entre as arenavirose e as FHV causada pelos vírus da dengue e da febre amarela, amostras de soro/plasma de casos suspeitos de dengue, laboratorialmente confirmadas ou não, foram gentilmente cedidas pelo LIV do IOC/FIOCRUZ para a pesquisa de arenavírus.

Considerando que a análise foi retrospectiva, esta etapa do estudo foi constituída por amostras de soro e plasma de 50 pacientes, das epidemias dos anos de 2007 e 2010, previamente analisadas para infecção pelo vírus dengue, através de testes sorológicos e moleculares realizados pelo LIV. Por se tratarem de amostras de fase aguda da doença, foram realizados testes moleculares na tentativa de identificar o genoma dos arenavírus nessas amostras, seguidos de sorologia para avaliar o possível contato dos pacientes negativos nas análises moleculares.

4.2.2.1 Análise Molecular

A extração do RNA total foi realizada utilizando kit comercial *QIAamp®Viral RNA mini Kit* (Qiagen®), seguindo os protocolos do fabricante. Para a extração foram utilizados 140µL de soro/plasma adicionados em 560µL de tampão AVL em um microtubo de 1,5mL e misturados

num agitador por 15 segundos e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, os microtubos contendo a mistura (soro/AVL) foram centrifugados 6000x g por 15 segundos para remover gotas da parte interna da tampa. 560µL de etanol (96-100%) foram adicionados à mistura e homogeneizados por 15 segundos e novamente centrifugados a 6000x g por 15 segundos. Após esta etapa, 700µL mistura (soro/AVL/etanol) foi transferida para a coluna *QIAamp Spin* (Qiagen®), e centrifugada a 6000x g por 1 minuto. Em seguida a coluna foi transferida para um tubo coletor de 2 mL limpo e o tubo contendo o filtrado foi descartado. O restante da mistura foi adicionado na coluna e novamente foi centrifugada a 6000x g por 1 minuto. Após isso, foram adicionados 500µL do tampão AW1 nas colunas *QIAamp Spin* (Qiagen®), seguido de centrifugação de 6000x g por 1 minuto. A coluna *QIAamp Spin* (Qiagen®), foi inserida em um novo tubo coletor de 2 mL limpo e o tubo contendo o filtrado foi descartado. Posteriormente foram adicionados 500µL do tampão AW2 na coluna *QIAamp Spin* (Qiagen®), que foi centrifugada a 20000x g por 3 minutos. A coluna *QIAamp Spin* (Qiagen®), foi então inserida em um tubo coletor de 2 mL limpo e o tubo coletor contendo o filtrado foi novamente descartado.

A coluna *QIAamp Spin* (Qiagen®), foi colocada em um novo tubo coletor e centrifugado a 20000x g por 1 minuto, para retirar o excesso de etanol na membrana da coluna. Cuidadosamente e foram adicionados 40µL de tampão AVE na coluna *QIAamp Spin* (Qiagen®). A coluna foi incubada a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugada a 6000x g por 2 minutos. O RNA foi então armazenado em alíquotas de 10 µL em freezer -80°C.

A partir do RNA total extraído de amostras de sangue foi realizada a síntese cDNA e a sua amplificação posterior utilizando o kit comercial *SuperScript. III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, San Diego, CA) associado a oligonucleotídeos específicos para uma porção da região codificante da GPC dos arnavírus da América do Sul: M13 (5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCG CAC AGT GGA TCC TAG GC -3') e 951R (5' - CCA YTI TTC IAG RCA GTA ICC ICC AGG 3' -3') e Arena 1f (5'- CWA TRT ANG GCC AIC CIT CIC C -3') - Arena 1r (5' TNR WYA AYC ART TYG GIW CIR TKC C 3'), descrito por Garcia e colaboradores (García et al. 2000). Para reação, realizadas separadamente para cada set de iniciadores, foram utilizados: 8.8 µL de H₂O livre de nuclease 12.5 µL de Mix de reação 2X (1.6 mM MgSO₄ 200 µM de dNTP), 0.2 µL de MgSO₄ a 50 mM, 1 U de *SuperScript III RT/ Platinum® Taq DNA Polymerase* e oligonucleotídeos foram

adicionados numa concentração final de 0.2 μM . A esta mistura foram adicionados 2 μL de RNA, num volume final de 25 μL que foram submetidos ao seguinte ciclo de amplificação: 48°C por 45 minutos (síntese de cDNA), 94°C por 2 minutos (desnaturação) seguido de 40 ciclos a 94°C por 1 min /52°C por 1 minuto/ e 68°C por 1 minuto e uma extensão final de 68°C por cinco minutos, em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Por fim, o DNA produzido foi estocado à -20°C

O produto da RT- PCR com os iniciadores Arena 1r e Arena 1f serviram de *template* para a reação de *nested* com os iniciadores Arena 2f (5'- CAN ANY TTR TAN ARN AIR TTY TCR TAI GG -3') e Arena 2r (5'- AGY YTN KNN GCN GCI GTI AAR GC -3'). Foram utilizados: 14 μL de H₂O livre de nuclease, 0,25 a 20mM 12.5 μL de 10X *PCR Gold Buffer* (150 mM Tris-HCl, 500 mM KCl pH 8.0), 0.2 μL de MgCl a 25 mM, 1,25 U de AmpliTaq Gold DNA Polymerase, LD 5 Units/ μL e oligonucleotídeos numa concentração final de 0.2 μM . A esta mistura foram adicionados 2 μL do produto da RT-PCR, num volume final de 25 μL que foram submetidos ao ciclo de amplificação de 95°C por 7 minutos (desnaturação) seguido de 30 ciclos a 94°C por 50 seg /52°C por 1 minuto/ e 68°C por 45 segundos e uma extensão final de 68°C por cinco minutos em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Por fim, o DNA produzido foi estocado à -20°C.

4.2.2.2. Teste sorológico

Para melhor compreender a dinâmica dos arenavírus no estado e na população estudada foi realizado concomitantemente o teste sorológico como descrito na seção 4.2.1.2. para, assim, verificar evidência sorológica de contato dessa população com os arenavírus.

4.3. Amostras de roedores silvestres

4.3.1. Área de coleta

O Estado do Mato Grosso do Sul possui aproximadamente 357.145,532 km² dividido em 79 municípios com uma densidade populacional de 6,86 (IBGE 2010). A principal cobertura vegetal do estado é o Cerrado que cobre quase toda a sua totalidade. Roedores silvestres foram previamente capturados, durante expedições de campo independentes, com diferentes desenhos

amostrais, conduzidas em localidades distintas do estado do Mato Grosso do Sul, em diferentes anos.

4.3.1.1. Município de Sidrolândia

O município de Sidrolândia (Figura 4.1) possui uma área de 5.286,405km² com uma densidade demográfica de 5,74 hab/km², localizado na região centro-norte do Mato Grosso do Sul (20°55'55"S / 54°57'39"W), a 484m de altitude e a 60km de distância da capital do estado. Com uma população de 42.132 habitantes, aproximadamente 34% na região rural, Sidrolândia é reconhecido como o município com o maior número de assentamentos rurais legais, um total de onze, além de outros sem regulamentação legal (IBGE, 2010).



Figura 4.1. Estado do Mato Grosso do Sul, destacando os três municípios onde ocorreram as capturas dos roedores silvestres ■ Cassilândia; ■ Dois Irmãos do Buriti; ■ Sidrolândia e a capital do estado ■ Campo Grande. (Fonte: IBGE)

A cobertura vegetal original do município era o Cerrado aberto denso (Cerradão) e a floresta aluvial, que ocupavam as margens dos cursos d'água. Atualmente estas formações deram lugar às pastagens plantadas e lavouras e, assim, existem poucas áreas onde a vegetação original pode ser encontrada.

Com um clima predominante úmido a sub-úmido, no município os meses mais secos são junho, julho e agosto e os mais chuvosos, novembro, dezembro e janeiro. A precipitação pluviométrica varia de 1.500 a 1.750 mm anuais e são regulares, com período seco, inferior a quatro meses, correspondendo à deficiência hídrica de 350 a 500 mm (Secretaria de Estado de Meio Ambiente, do Planejamento, da Ciência e Tecnologia – SEMAC). Neste município os roedores foram capturados em quatro localidades diferentes no mês de setembro no ano de 2008, como mostrado na Tabela 4.1

Tabela 4.1. Regiões de amostragem de pequenos mamíferos no município de Sidrolândia.

Localidade	Região de amostragem	Pontos de captura	Fitofisionomia da Área
Localidade 1	C	01	Capim margeando mata ciliar, limítrofe a campo de milho colhido
		20	
	C	21	Capim margeando mata ciliar, limítrofe a campo de milho colhido e vegetação de área alagada
		40	
	C	41	Capão de mata ciliar com solo degradado pelo gado
		60	
Localidade 2	D	01	Capim com arbustos e árvores esparsas. Área em declive. Terreno brejoso e mata ciliar
		40	
		41	Borda de pasto, e cerrado degradado pelo gado
		50	
Localidade 3	A	01	Pasto abandonado com arbustos, árvores altas esparsas. Na segunda metade da trilha: Mata úmida alta, sub-bosque
		20	
		21	Borda entre mata e roça com milho em colheita, margeando pequeno córrego
		60	
	CG	01	Braquiária, margem da estrada
		40	
Localidade 4	CC	01	Borda de pasto ao longo de capoeira, com córrego acidentado e rocha
		20	
	CC	21	Cerrado degradado com sub-bosque formado apenas por coqueirinho margeando o pasto
		40	
	CC	41	Capão de mata com arbustos e árvores baixas margeando o córrego
		60	

4.3.1.2. Município de Dois Irmãos do Buriti

O município de Dois Irmãos do Buriti (Figura 4.1) possui uma área de 2.344,593km², na mesorregião do pantanal sul-matogrossense (20°40'47"S / 55°17'46"W), a 320m de altitude. Apresenta um pequeno predomínio da fitofisionomia do Cerrado em relação às áreas de tensão ecológica, representado pelo contato do Cerrado com a Floresta Estacional. A referida região apresenta as seguintes sub-formações: Cerrado arbóreo denso e aberto, com remanescentes da vegetação natural e agricultura, reflorestamento e pastagens como vegetação antrópica, já que o município é um dos maiores produtores de laranja, tomate e café do estado.

O clima apresenta-se úmido a sub-úmido, com índice efetivo de umidade variando de 20 a 40%. As temperaturas médias anuais conservam-se acima de 20°C, sendo que os totais de precipitação estão entre 1.200 mm e 1.500 mm, considerando que ocorre de um a dois meses secos na época mais fria (Secretaria de Estado de Meio Ambiente, do Planejamento, da Ciência e Tecnologia – SEMAC).

Tabela 4.2. Regiões de amostragem de pequenos mamíferos no município de Dois Irmãos do Buriti

Localidade	Região de amostragem	Pontos de captura	Fitofisionomia da Área
Localidade 1	D	01	Cerrado (campo sujo com vegetação secundária) e pasto de braquiária
		20	
		21	
		40	
Localidade 2	C	01	Mata de cerrado com braquiária no entorno
		20	Borda de cerrado à margem da estrada
		21	
		40	
		41	Capão de cerrado alto com árvores acima de 2 metros, envolto por pasto
60			
Localidade 3 <i>Assentamento Paulo Freire</i>	A	01	Morro com pedregulhos, cerrado, capim alto, braquiária, várzea
		20	
		21	
		40	
Localidade 4 <i>Assentamento Paulo Freire</i>	E	01	Borda de pasto ao longo de capoeira, com córrego acidentado e rocha
		20	Cerrado degradado com sub-bosque formado apenas por coqueirinho margeando o pasto
		21	
		40	Capão de mata com arbustos e árvores baixas margeando o córrego
		41	
60			

4.3.1.3. Município de Cassilândia

O município de Cassilândia (Figura 4.1) possui uma área 3.649,724 km² localizado na região leste do Mato Grosso do Sul (19°06'46"S / 51°44'02"W), com aproximadamente 20.966 habitantes. (IBGE, 2010). Sendo a pecuária a principal fonte de renda desse município, a cobertura vegetal predominante é a pastagem plantada, apresentando ainda algumas áreas de Campo Cerrado, contato Cerrado/Floresta Estacional e lavoura.

O município apresenta clima tropical. Na porção norte/nordeste as temperaturas médias do mês mais frio são menores que 20°C e maiores que 18°C. O período seco estende-se de quatro a cinco meses. A precipitação anual varia de 1.200 a 1.500mm. Na porção noroeste as temperaturas são maiores que 15°C e menores que 20°C. A duração do período seco é de dois a três meses e as precipitações variam de 1.500 a 1.700 mm anuais (Secretaria de Estado de Meio Ambiente, do Planejamento, da Ciência e Tecnologia – SEMAC).

A captura dos animais neste município foi realizada por uma demanda da região, devido à instalação da uma usina hidroelétrica. As coletas foram realizadas no período de pré-enchimento do reservatório da usina, em expedições de campo organizadas a cada dois meses, de abril de 2008 a janeiro de 2009 (Tabela 4.3). A usina foi inaugurada no ano de 2009 no rio Aporé, na divisa entre os municípios de Cassilândia (MS) e Aporé (Goiás). O Rio Aporé é afluente pela margem direita do rio Paranaíba e limite entre os estados de Mato Grosso do Sul e Goiás. É navegável nos 35 km a partir da sua foz.

A pequena central hidrelétrica (PCH) chamada de Planalto (Figura 4.2), assim como as demais PCHs, é considerada por seus idealizadores uma alternativa sustentável de gerar energia, uma vez que não exigem a construção de grandes reservatórios, evitando os respectivos impactos no solo e nos cursos d'água. Sem interferência ao regime fluvial e mantendo as séries históricas de vazões exatamente iguais as que sempre foram, o formato do reservatório utilizado neste modelo de projeto se assemelhe ao de um rio cheio.

Tabela 4.3. Regiões de amostragem de pequenos mamíferos no município de Cassilândia.

Localidade (rio Aporé)	Região de amostragem	Pontos	Fitofisionomia da Área
Margem esquerda	A	23	Transição entre Floresta Estacional Decidual e Cerradão
		22	
Margem direita	B	23	Transição entre Floresta Estacional Decidual, Mata Ciliar e Pastagem com árvores isoladas
		22	
Margem esquerda	C	23	Cerrado <i>sensu strictu</i> (típico)
		22	
Margem esquerda	D	23	Cerrado <i>sensu strictu</i> (típico) em regeneração
		22	
Margem direita	E	15	Transição entre Floresta Estacional Decidual e Mata Ciliar
		8	
		7	
Margem esquerda	F	15	Transição entre Floresta Estacional Decidual e Cerradão
		3	
		12	
Margem direita	G*	30	Transição entre Canavial e Pastagem

* Região de amostragem adicionada ao estudo a partir das coltas de junho de 2008.



Figura 4.2. Usina hidroelétrica PHC Planalto situada no município de Cassilândia/MS ainda em construção. (Fonte: www.brennardenergia.com.br)

4.3.2. Captura de roedores silvestres

Em cada um dos municípios estudados estabeleceu-se um número de transectos lineares com, no mínimo, 10 estações de captura. Em cada ponto de captura foi armada uma armadilha do tipo *live-trap*, modelo *Tomahawk* ou do tipo *Sherman*, apropriadas para a captura de pequenos mamíferos vivos com até 3 kg. A disposição das armadilhas seguiu o padrão previamente estabelecido, no qual uma armadilha do tipo *Sherman* foi colocada em cada estação de captura e uma armadilha do tipo *Tomahawk* a cada três estações de captura. Todos os transectos receberam numeração individual, sequencial para as estações de captura. Este tipo de identificação dos transectos e das estações de captura permitiu o registro da exata localização das capturas, e, portanto, permite também a soltura do animal (quando necessário) no mesmo ponto. A isca utilizada foi uma mistura composta de bacon, aveia, banana e pasta de amendoim. O período de coleta variou dependendo da localidade.

As armadilhas eram montadas durante a tarde e vistoriadas na manhã seguinte. Os roedores capturados eram levados para local adequado onde eram submetidos à coleta de dados como biometria, peso, sexo e condição reprodutiva, e posteriormente, anestesiados para a coleta de sangue e amostras de tecidos, dentro das normas de biossegurança preconizadas por Mills e colaboradores, 1995.

Após prévia anestesia com cloreto de Ketamina (foi escolhido um valor médio para a dose em cada faixa de peso dos animais capturados, baseado em extrapolação alométrica) todos os animais foram submetidos à coleta de sangue por punção cardíaca. As amostras de sangue foram coletadas com o uso de seringas de 1 a 3mL, de acordo com o tamanho do animal. Cada amostra foi armazenada em tubos de polipropileno para microcentrífuga de 1,5mL de volume em alíquotas que variavam de 0,5 a 1mL. As mesmas foram devidamente encaminhadas ao laboratório de Hantavirose e Rickettsioses do Departamento de Virologia do IOC, onde foram estocadas em um freezer a -20°C.

Após a coleta de sangue, os roedores foram submetidos à eutanásia e, em seguida, amostras de tecidos de fígado, baço, rim, pulmão e coração foram obtidas e acondicionadas criogenicamente em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA no LHR - IOC. Foram realizadas, também, a coleta de medula óssea para análise citogenética (cariótipo) e preparação

do esqueleto e taxidermia dos espécimes coletados para depósito em coleção científica do Museu Nacional/Universidade Federal do Rio de Janeiro, como material testemunho.

A diversidade de espécies de pequenos mamíferos é ainda pouco conhecida e a sistemática apresenta-se, para muitos grupos, bastante confusa. Neste caso, faz-se necessária a utilização de técnicas citogenéticas (cariotipagem), pois a identificação específica nem sempre é possível considerando-se somente os caracteres morfológicos e morfométricos.

4.3.3. Identificação dos roedores

A identificação morfológica dos roedores foi baseada nas características qualitativas externas do crânio do animal (Oliveira & Bonvicino 2006). Para confirmar a identificação com base na morfologia, preparações cromossômicas foram obtidas a partir de culturas de medula óssea. As suspensões celulares foram cultivadas por 2 horas a 37⁰C em meio RPMI 1640, suplementado com 20 % de soro fetal bovino, com brometo de etídio (5mg/ml), e colchicina (10⁻⁶ M), como descrito por (Bonvicino et al. 1996). Por causa da falta de distinção morfológica entre as espécies de roedores sigmodontíneos intimamente relacionados, análises de dados de sequência de DNA do gene mitocondrial *citocromo b* foram realizadas para confirmar a identificação da espécie e estimar a relação filogenética de espécimes de hantavírus positivo (amostras com e sem dados cariotipagem). Amostras de DNA de roedores positivos para arenavírus foram extraídas a partir de amostras de fígado de acordo com os procedimentos descritos por Sambrook e colaboradores (1989). O *gene citocromo b* de aproximadamente 1140 pb foi amplificado com a utilização dos oligonucleotídeos com L14724 (Irwin et al. 1991) e MVZ 14 (Smith & Patton 1991) e sequenciados com os mesmos oligonucleotídeos somados aos iniciadores CITB-Sot-in1 e CITB-Sot-in 2 (Cassens et al. 2000), no sequenciador automático de DNA ABI PrismTM 377.

4.3.4. Identificação da infecção por *Arenavirus* nos roedores do Mato Grosso do Sul

4.3.4.1. Extração RNA viral de amostras de tecidos

As amostras de fragmentos de fígado ou baço de roedores foram submetidas à extração do RNA viral pelo kit comercial *PureLink Micro-to-Midi total RNA purification kit* (Invitrogen, San Diego, CA) seguindo o protocolo do fabricante.

Para a extração foram obtidos aproximadamente 50 mg de tecido utilizando bisturi ou tesoura estéril, subsequentemente, o tecido foi congelado, em banho de nitrogênio líquido e triturado manualmente, utilizando um pistilo. Em seguida foram adicionados 120µL de Trizol[®] (Invitrogen) e o tecido foi complementarmente dissolvido com o auxílio de um rotor para pistilo. Posteriormente, 880µL de Trizol[®] foram adicionados e após homogeneização sob agitação o material triturado foi incubado à temperatura ambiente por cinco minutos. Na etapa seguinte 200µL de clorofórmio foram adicionados para cada 1mL de Trizol[®] e o tubo foi agitado vigorosamente por 15 segundos e incubado por três minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000x g por 15 minutos a uma temperatura de 4°C. Após a centrifugação, 400µL da fase aquosa da solução foram transferidos para um novo microtubo devidamente identificado. Junto a fase aquosa foi adicionado etanol a 70%, no mesmo volume, para uma concentração final de etanol de 35%, seguida de uma breve agitação. Em sequência, 700µL da mistura (fase aquosa/etanol) foram transferidos para uma coluna fornecida pelo kit e submetidos à centrifugação a 12.000x g por 15 segundos à temperatura ambiente. O líquido que passou pela coluna foi desprezado e a coluna recolocada em um novo tubo coletor. Essas etapas foram repetidas a partir da adição de mais 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, o líquido que passou pela coluna foi descartado do tubo coletor seguido pela colocação da coluna em um novo tubo coletor. Na etapa seguinte, 500 µL do tampão de lavagem II foram adicionados na coluna e submetidos à centrifugação a 12.000x g por 15 segundos à temperatura ambiente. O líquido do tubo coletor foi desprezado e a coluna foi recolocada no mesmo tubo coletor. Estas etapas foram repetidas a partir da adição de 500µl do tampão de lavagem II por mais uma vez.

Por fim as colunas foram centrifugadas vazias a 12.000x g por um minuto à temperatura ambiente para eliminar o excesso de etanol da membrana, com posterior descarte do tubo coletor. A coluna foi colocada em um microtubo de 1,5mL e 30µL de água livre de nucleases foram adicionados no centro da coluna de forma cuidadosa, seguida de uma incubação por um minuto à temperatura ambiente uma nova centrifugação da coluna com tubo de 1,5mL a 12.000x g por 2 minutos à temperatura ambiente. O RNA extraído foi armazenado em alíquotas de 10 µL em freezer -80°C.

4.3.4.2. Extração RNA viral de amostras de soro

As amostras de soro de roedores silvestres dos quais não foram coletadas amostras de fígado ou baço, foram submetidas à extração de RNA pelo kit comercial *QIAamp®Viral RNA mini Kit* (Qiagen®), seguindo os protocolos do fabricante, conforme descrito previamente no item 4.2.2.1.

4.3.4.3. Transcrição reversa do RNA (RT) seguida de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A partir do RNA total extraído de amostras de roedores foram realizadas a síntese cDNA e a sua amplificação posterior utilizando o kit comercial *SuperScript. III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, San Diego, CA) associado a oligonucleotídeos específicos para uma porção da região codificante da GPC dos arnavírus da América do Sul: M13 (5´- TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCG CAC AGT GGA TCC TAG GC -3´) e 951R (5´ - CCA YTI TTC IAG RCA GTA ICC ICC AGG 3´ -3´) conforme descrito no item 4.2.2.1 .

Todas as amostras de RNA dos roedores que apresentaram amplificação específica, na reação descrita acima, foram utilizadas em uma segunda reação de síntese de cDNA com posterior amplificação com oligonucleotídeos específicos para a região da NP do segmento S dos arnavírus da América do Sul descritos por (Bowen et al. 1996b). Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit comercial *Mini Kit SuperScript III™ Reverse Transcriptase* (Invitrogen, San Diego, CA): o RNA extraído foi ressuspendido em 30µL de H₂O nuclease free e 1µL de dNTP a 10mM e 0.2 µM de oligonucleotídeo 19C (5´- GCA CAG TGG ATC CTA GGC – 3´). Esta mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). O tubo foi transferido posteriormente para um banho de gelo, por um minuto. Em seguida, foram acrescentados 2µl DTT 0.1M, 1µl RNaseOUT™ (40U/µl), 2µL do tampão 10X RT (200mM Tris-HCl – pH8.4; 500mM KCl), 4µl MgCl₂ a 25mM, 1µL *SuperScript™ III RT* (200U/µL) e novamente levados para o termociclador e incubados a 50°C por 50 minutos e 85°C por 5 minutos. Subsequentemente, a mistura foi acrescida de 1µl de *E. coli RNase H* (2U/ µL) e novamente levada ao termociclador e incubada a 37°C por 20 minutos, resultando em um volume final de 20µl de cDNA.

A partir do cDNA sintetizado na reação descrita acima, foi realizada a amplificação de um fragmento da NP, utilizando os oligonucleotídeos 1010C (5'-TCI GGI GAI GGI TGG CC-3') e 1696R (5'- ACA TIA TGC AIT CIA ICA GIG CAC AGT G -3') Para a reação foram utilizados: 14 µL de H₂O livre de nuclease, 0,25 a 20mM 12.5 µL de 10X *PCR Gold Buffer* (150 mM Tris-HCl, 500 mM KCl pH 8.0), 0.2 µL de MgCl a 25 mM, 1,25 U de AmpliTaq Gold DNA Polymerase, LD 5 U/µLe oligonucleotídeos numa concentração final de 0.2 µM. A esta mistura foram adicionados 2 µL de cDNA, num volume final de 25 µL que foram submetidos ao ciclo de amplificação sugerido pelos autores dos oligonucleotídeos (Bowen et al. 1996b): 95°C por 7 minutos (desnaturação) seguido de 36 ciclos a 95°C por 1 min /45°C por 1 minuto/ e 68°C por 2 minutos e uma extensão final de 68°C por cinco minutos em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Por fim, o DNA produzido foi estocado à -20°C.

4.3.4.4. Análise de DNA em gel de agarose

A agarose a 1,5% foi preparada em tampão TBE 0,5X. As amostras de DNA foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese em tampão TBE 1X. A visualização do DNA foi realizada após o gel ter sido submetido ao banho de GelRed™ (Uniscience) durante 10 minutos, através da luz ultravioleta por meio de transluminador.

4.4. Seleção e desenho de oligonucleotídeos

Para melhor caracterizar os arenavírus detectados neste estudo foram selecionados iniciadores para o sequenciamento completo do segmento genômico S dos arenavírus. Os iniciadores foram desenhados com auxílio do programa MEGA 5.2 (Tamura et al. 2011) e direcionados para sequências conservadas do genoma do vírus.

As regiões conservadas foram estabelecidas a partir de alinhamento múltiplo de sequências completas de linhagens próximas filogeneticamente de arenavírus brasileiros e sul-americanos pela ferramenta MUSCLE (Edgar 2004)(Thompson et al., 1994)no programa MEGA 5.2. As espécies de arenavírus selecionadas para o alinhamento foram baseadas nos resultados obtidos durante a realização do estudo. Bases degeneradas foram utilizadas nos iniciadores em posições com divergência de sequência entre as linhagens analisadas. Essa análise de

conservação de sequência foi também empregada na adaptação de alguns iniciadores descritos em literatura.

A amplificação do segmento S completo foi dividida em quatro fragmentos chamados Início, M1, M2 e Fim que apresentam regiões sobrepostas (Figura 4.3). A amplificação por PCR tanto dos segmentos S1 a 4 foram realizadas utilizando-se 2µl do cDNA (seção 4.XXX) acrescidos 15 µL de H₂O livre de nuclease, 0,25 a 20mM 12.5 µL de 10X *PCR Gold Buffer* (150 mM Tris-HCl, 500 mM KCl pH 8.0), 0.2 µL de MgCl a 25 mM, 1,25 U de AmpliTaq Gold DNA Polymerase, LD 5 Units/µL e oligonucleotídeos numa concentração final de 0.2 µM. A mistura de 25 µL foi submetida a um aquecimento inicial de 95°C por 10 minutos seguida de 40 ciclos a 94°C por 40 segundos, 41°C por 1 min e 20 segundos, 72°C por um min e 30 segundos se um período final de extensão de 10 minutos a 72°C.

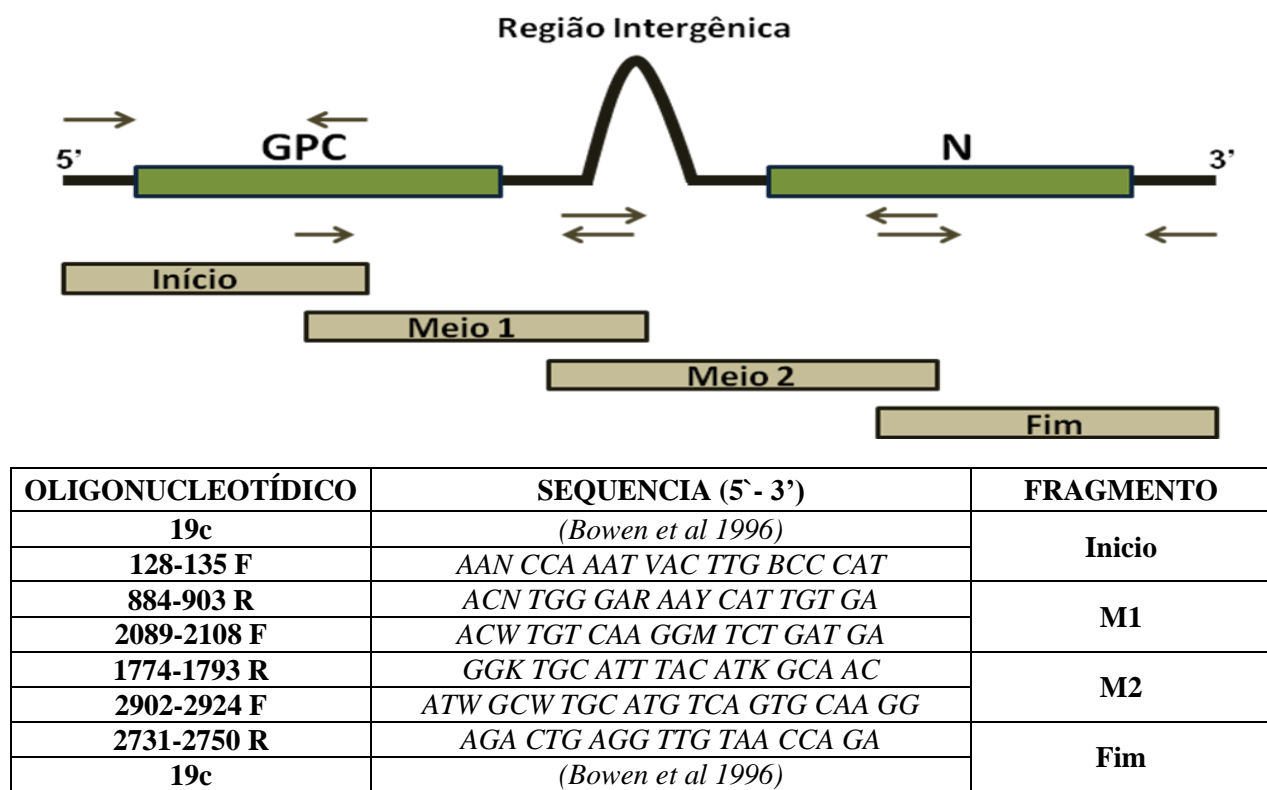


Figura 4.3. Estratégia para amplificação e sequenciamento direto dos arenavírus incluídos no estudo. N refere-se ao gene da nucleoproteína e GPC ao gene precursor da glicoproteína. A linha verde e preta a fina representam as regiões codificante e não codificante, respectivamente. As setas representam os iniciadores utilizados apenas para o sequenciamento.

4.5. Purificação e sequenciamento de nucleotídico

Os produtos de DNA 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 com ajuda de um bisturi, pesadas e transferidas para tubos de 1,5mL. O tampão de solubilização (PROMEGA) foi adicionado a cada tubo na proporção de 10µL/10mg de gel e incubado 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 centrífuga 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 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 de iniciador senso e do iniciador antisenso (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).

As sequências de nucleotídeos e seus cromatogramas de sequenciamento dos fragmentos amplificados do segmento genômico S foram analisados por meio do programa MEGA 5.2 (Tamura et al. 2011). Inicialmente as sequências foram analisadas contra o banco de dados

depositado no GenBank utilizando a ferramenta BLASTn. Em seguida, as sequências obtidas foram manipuladas no programa MEGA 5.2. 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 5.2. Uma sequência consenso foi estabelecida, e as divergências de nucleotídeos entre as sequências foram esclarecidas pela análise dos cromatogramas de sequenciamento.

4.6. Análise filogenética

Para todas as análises filogenéticas realizadas, as sequências obtidas no sequenciamento e as obtidas em bancos de dados foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE (Edgar 2004) no programa Seaview4 (Gouy et al. 2010).

As relações filogenéticas foram estimadas usando a inferência filogenética por Máxima Verossimilhança (MV) implementado na ferramenta MEGA 5.2 sob o modelo de evolução de sequência JTT + G, que foi escolhido depois de testes de modelos alternativos hierarquicamente pela computação em razão de verossimilhança na mesma ferramenta. As árvores filogenéticas foram construídas com suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas).

4.7. Análise estatística

Os dados sócio-demográficos e de infecção dos indivíduos analisados foram inseridos em banco de dados do programa Excel. Uma análise descritiva foi, então, realizada e as correlações entre as variáveis demográficas, as relacionadas as questões abordadas no questionário (tipo de atividade, tempo de realização da atividade, utilização de EPIs) e a presença ou ausência de anticorpos anti-arenavírus. Utilizando o teste qui-quadrado para avaliar a significância estatística.

4.8. Considerações éticas

O estudo com amostras humanas está inserido nos seguintes projetos coordenados pela Dra Elba Regina Sampaio de Lemos:

- “Estudo das condições de saúde dos profissionais que manuseiam animais silvestres: prevalência e suscetibilidade a infecções virais, bacterianas e por parasitas, com ênfase nas

Hantavírose”, (Processo nº 403601/2008 –CNPq) e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Protocolo 409/07).

- Vigilância epidemiológica de hantavírose e rickettsioses lato sensu dentro do programa de vigilância do Ministério da Saúde aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Protocolo 559/10) (Anexo 10.3).

Todo o trabalho com os animais incluídos nesta pesquisa foi encaminhado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/FIOCRUZ, conforme protocolo N° P.0294-06 e realizado de acordo com licença (N° 068/2005) concedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)/ Coordenação Geral de Fauna (CGFAU).

5- RESULTADOS

5.1. Identificação da infecção por *Arenavirus* em profissionais de saúde que manuseiam animais

5.1.1. Perfil da População

A população foi constituída de 292 profissionais com idade entre 18 e 70 anos, concentrada na faixa etária dos 18 aos 26 anos (68.1%). A maioria dos participantes foi do sexo feminino. Na Tabela 5.1 é apresentado um breve sumário das características da população estudada, referentes ao sexo e à idade dos participantes. Verificou-se que a maioria dos profissionais, 143 participantes (49%), relatavam menos de quatro (04) anos de atividades com animais e 31 (10,6%) apresentaram um histórico de contato e manuseio de animais por um período igual ou superior a 10 anos.

Tabela 5.1. Idade e sexo dos profissionais que manuseiam animais incluídos no estudo de prevalência de anticorpos-anti arenavírus.

<i>Faixa Etária</i>	<i>Homens</i>	<i>Mulheres</i>	<i>Total (Faixa Etária)</i>
18 a 26	60	139	199 (68.1%)
27 a 35	25	37	62 (21.2%)
36 a 46	10	10	20 (6.9%)
≥ 47	7	4	11 (3.8%)
Total	102 (35.0%)	190 (65.0%)	292

A partir da análise das atividades associadas com captura e processamento de animais que constavam no questionário, foi possível observar uma sobreposição das atividades, já que a maioria dos profissionais referia participar de mais de uma atividade envolvendo animais, mais frequentemente, com mamíferos, aves e répteis (Tabela 5.2). A captura de animais silvestres, além de mais frequente, foi a atividade realizada em todos os 26 estados brasileiros e no Distrito Federal. As áreas de coleta com mais frequência foram na região sudeste, onde os profissionais capturaram predominantemente roedores, marsupiais, morcegos, felinos e primatas (Figura 5.1).

Tabela 5.2. Informações sobre as atividades associadas com captura e processamento de animais dos profissionais que manuseiam animais incluídos no estudo de prevalência de anticorpos-anti arenavírus.

<i>Atividades</i>	<i>Número de profissionais</i>
Captura de Animais Silvestres	242
Necropsia de Animais Silvestres	136
Coleta de Animais Invertebrados	46
Manuseio de Animais Domésticos	128
Necropsia de Animais Domésticos	18
Bioterismo	50
Outras atividades*	54

*Taxidermia foi à atividade mais citada no campo no item sobre outras atividades.

Quando questionados sobre a utilização de EPIs, 61 (20.8%) dos profissionais informaram que não os utilizavam, 23 (9.5%), utilizam eventualmente, 167 (57.1%) utilizaram EPIs em todas as atividades e 41 não responderam. Luvas de procedimento, de contenção e perneiras foram os EPIs mais citados no questionário. Não houve uma correlação estatisticamente significativa entre o uso de EPIs e a idade dos participantes (p valor = 0.161554). Porém a relação sexo e utilização desses equipamentos demonstrou significância estatística (p valor = 0.041396). A não utilização de EPIs parece estar associada ao sexo feminino conforme mostra a Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Relação entre sexo e frequência de utilização de EPIs entre os profissionais que manuseiam animais participantes do estudo sobre prevalência de anticorpos anti-arenavírus.

Sexo	Ignorado	Eventualmente	Não utiliza	Todas as atividades
Mulheres	23	18	47	102
Homens	18	5	14	65
TOTAL	41	23	61	167

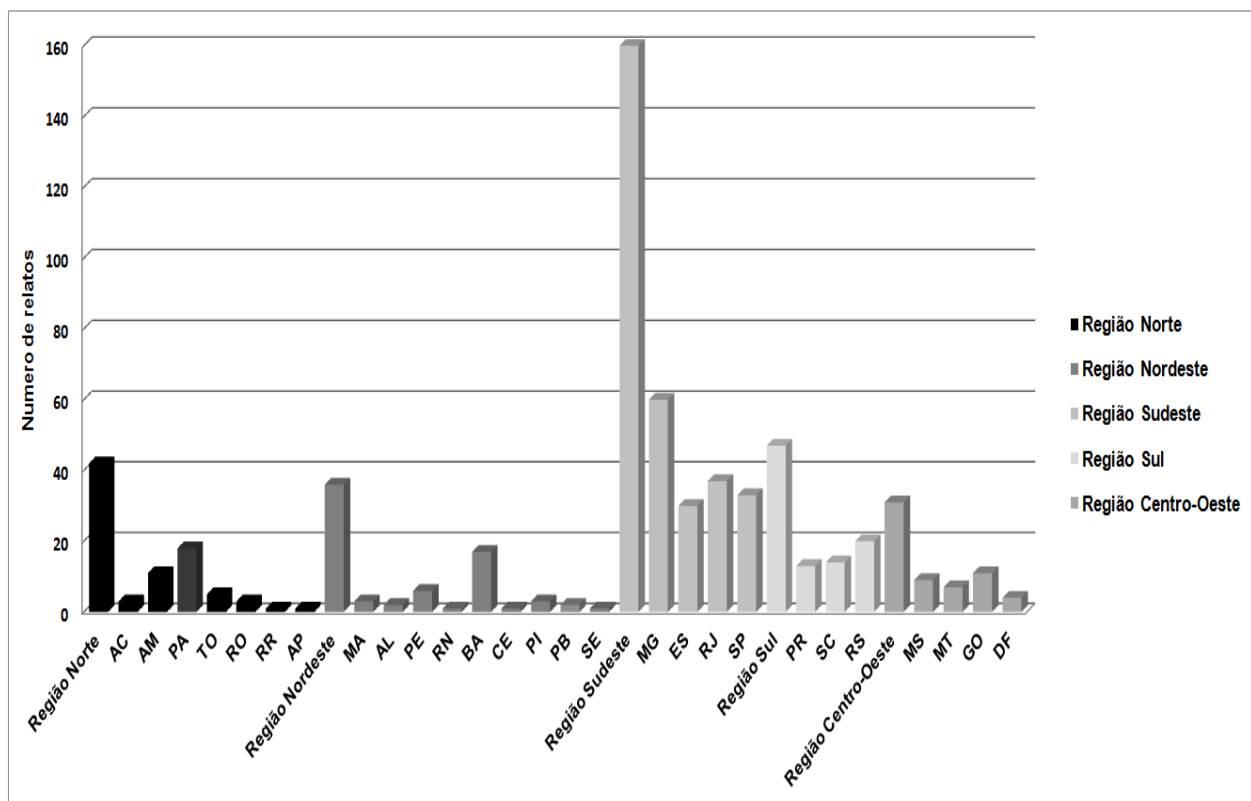


Figura 5.1. Local de captura de animais silvestres, por unidade federativa e região geográfica, relatados pelos participantes do estudo de prevalência de anticorpos-anti arenavírus.

5.1.2. Inquérito Sorológico

Das 292 amostras analisadas, duas amostra de soro (0.7%) demonstraram sororeatividade. Uma amostra de uma estudante do sexo feminino, de 22 anos, do curso de gestão ambiental, residente no município de Curitiba (PR), que relatava exercer atividades de campo por um período de dois anos. As atividades relatadas na ficha eram necropsia de aves e mamíferos além de trabalhos que envolviam trilhas na Mata Atlântica para conservação de carnívoros com busca de vestígios desses animais (carcaças). Em relação à biossegurança, a estudante relatou a utilização de luvas e botas de borracha em todas as atividades.

O segundo participante sororreativo foi um homem de 30 anos, biólogo, residente no estado de São Paulo, com histórico de viagens, durante o período de oito anos, para realização de capturas de aves em rede de neblina e de mamíferos com armadilhas, nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Rio de Janeiro e Espírito Santo, e também no

continente africano em Moçambique, o participante informou a utilização eventual dos seguintes EPIs: botas, calças, camisa manga longa, boné, repelente e protetor solar.

5.2. Identificação da infecção por *Arenavirus* em pacientes com suspeita de dengue do Mato Grosso do Sul

5.2.1. Perfil da População

Nesta etapa do estudo retrospectivo foram utilizadas amostras de soro ou de plasma de 50 pacientes (Tabela 5.4), das epidemias dos anos de 2007 e 2010, no estado do MS. Das 39 amostras do ano de 2007, 27 possuíam o diagnóstico laboratorial confirmatório para dengue e 12, não apresentavam etiologia definida. Entre as atividades profissionais relatadas pelos pacientes, predominaram o trabalho administrativo e atividades em instituições de ensino (professores e estudantes). Não houve diferença entre os sintomas relatados pelos pacientes confirmados e não confirmados e todos apresentavam febre, mialgias e cefaleia (Tabela 5.4).

Tabela 5.4. Dados demográficos e manifestações clínicas dos pacientes suspeitos de dengue confirmados e não confirmados (2007 e 2010), no estado de Mato Grosso do Sul.

		<i>DENV(+)</i>	<i>DENV(-)</i> 2007	<i>DENV(-)</i> 2010	TOTAL
Faixa Etária	16 a 30	12	6	5	23
	31 a 61	13	6	6	25
	Sem dados	2	-	-	2
Sexo	Masculino	18	2	6	26
	Feminino	9	10	5	24
Sintomas	Febre	26	12	8	36
	Cefaleia	24	12	9	45
	Mialgia	26	11	9	46
	Dor retro-orbitária	16	8	5	29
	Astenia	18	8	-	26
	Náuseas	16	11	6	33
	Tonturas	16	10	-	26
	Manifestações hemorrágicas*	19	5	2	26

*Manifestações hemorrágicas = exantema, petéquias, gengivorragia, metrorragia e epistaxe. (*DENV(+)* = casos suspeitos de dengue confirmados/ *DENV (-)* = casos suspeitos de dengue não confirmados).

Adicionalmente, 11 amostras de soro ou de plasma de pacientes com suspeitas de dengue, sem a confirmação laboratorial, dos meses de fevereiro e março de 2010, foram também

incluídas no estudo (Tabela 5.4). Os pacientes tinham idades de 16 a 59 anos de ambos os sexos. Alguns dos pacientes apresentavam comorbidades como infecção pelo vírus HIV e HCV, além de hipertensão arterial. Esses pacientes possuíam atividades diversas - estudante, diaristas, enfermeiro e comerciantes. Assim como os pacientes de 2007, todos os pacientes de 2010 residiam no município de Campo Grande – MS.

5.2.2. Testes Moleculares e Sorológicos

A amplificação de duas regiões do segmento genômico S dos arenavírus foi realizada para as 50 amostras dos pacientes e nenhuma apresentou amplificação de produtos no tamanho esperado para nenhuma das regiões alvos. Sendo assim, todas as amostras foram, subsequentemente, submetidas ao teste sorológico ELISA IgG anti-arenavírus, onde novamente, nenhuma das amostras analisadas apresentou reatividade.

5.3. Identificação da infecção por *Arenavirus* em roedores silvestres do Mato Grosso do Sul

5.3.1 Animais capturados

Nos três municípios de estudo foram coletados um total de 197 animais, composto por 180 roedores silvestres, pertencentes a 11 gêneros distintos, além de 17 marsupiais (Figura 5.2, Tabela 5.5). As espécies mais abundantes de roedores capturados foram *Necromys lasiurus* (72 animais capturados) seguida por *Calomys expulsus* (42 animais) e *C. callosus* (28 animais).

Tabela 5.5. Descrição do número total de animais coletados no estudo sobre arenavírus nos municípios de Sidrolândia, Dois Irmãos do Buriti e Cassilândia – MS.

Município	Número de animais capturados	Taxonomia	Espécies mais prevalentes	Sexo
Sidrolândia	70	11 gêneros 11 espécies	<i>C. callosus</i> e <i>N. lasiurus</i>	24F 46 M
Dois Irmãos do Buriti	6	5 gêneros 5 espécies	<i>Oecomys catherinae</i>	4F 2M
Cassilândia	121	11 gêneros 12 espécies	<i>N. lasiurus</i> e <i>C. expulsus</i>	56F e 66M

(F = fêmea / M= macho).

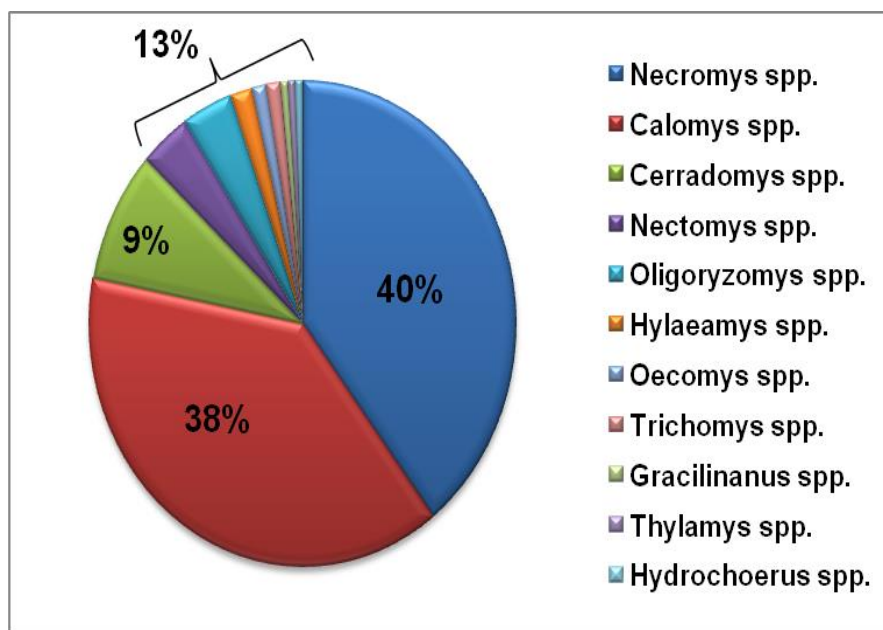


Figura 5.2. Porcentagem de gêneros de roedores silvestres capturados nos municípios de Sidrolândia, Dois Irmãos do Buriti e Cassilândia – MS.

Para realização deste estudo foram incluídas 125 amostras de três gêneros distintos de roedores coletados no estado do Mato Grosso do Sul (Tabela 5.6), todos os três já conhecidos, na literatura mundial, como reservatórios de arenavírus - *Calomys* spp.; *Necromys* spp. e *Oecomys* spp.. De acordo com os critérios estabelecidos, somente roedores com identificação taxonômica completa e que continham amostras de baço, fígado ou de soro acondicionadas no LHR foram selecionados para o estudo.

Tabela 5.6. Descrição dos animais analisados por município no estudo sobre arenavírus nos municípios de Sidrolândia, Dois Irmãos do Buriti e Cassilândia – MS.

Município	Número total de animais	Espécies	Sexo
Sidrolândia	48 roedores	(27) <i>Calomys callosus</i>	6F 21M
		(21) <i>Necromys lasiurus</i>	9F 12M
Dois Irmãos do Buriti	3 roedores	(2) <i>Oecomys catherinae</i>	2F
		(1) <i>C. callosus</i>	1M
Cassilândia	74 roedores	(45) <i>N. lasiurus</i>	20F 25M
		(29) <i>C. expulsus</i>	11F 18M

(F = fêmea / M = macho)

5.3.2 Pesquisa do genoma viral

A pesquisa por fragmentos do genoma viral em amostras de 125 roedores silvestres resultou na amplificação do mesmo em 35 amostras de fígado ou baço. Foi possível a amplificação do fragmento referente à GPC em todas as amostras, em uma etapa de triagem (Quadro 5.1 e 5.2). Apesar de confirmadas, posteriormente, por sequenciamento de nucleotídeo, os fragmentos genômicos amplificados apresentaram um peso molecular acima do esperado, cerca de 100 a 200 pares de base, dependendo do roedor infectado. Assim, amostras de *N. lasiurus* apresentaram bandas em gel de agarose próximas a 1100 nucleotídeos (nt) enquanto que amostras de *C. callosus* apresentavam *amplicons* de 1.000nt. Outro fato que chamou a atenção foi que as amostras de *N. lasiurus* do município de Cassilândia apresentaram bandas com pesos moleculares ainda maiores, cerca de 1.200 nt.

Quando utilizado um segundo par de iniciadores com uma região alvo diferente, a NP, a proteína mais conservada entre a família Arenaviridae, para confirmar as ampliações obtidas inicialmente, não houve concordância entre as amostras amplificadas e apenas 19 foram amplificadas (Quadro 5.1 e 5.2).

Para esclarecer os resultados obtidos e estabelecer a espécie de arenavírus responsável pela infecção dos roedores, foi realizado o sequenciamento nucleotídeo de todas as 35 amostras amplificadas para as diferentes regiões do segmento S dos arenavírus (Quadro 5.1 e 5.2). Assim, sequências recuperadas de 27 animais (08 *N. lasiurus* e 18 *C. callosus*), nas diferentes regiões do segmento S, foram comparadas com outras sequências depositadas e disponíveis no GenBank (Quadro 5.1 e 5.2).

As sequências nucleotídicas dos genes das proteínas GPC e NP obtidas de roedores da espécie *C. callosus* apresentaram similaridades de 79.0% (GPC) e 80.0% (NP) com as sequências do vírus Latino variante MARU (AF512830), também recuperadas de roedores *C. callosus* na Bolívia.

Apenas sequências parciais da proteína GPC de *N. lasiurus* foram recuperadas dos produtos gerados com os iniciadores utilizados na triagem. As sequências nucleotídicas parciais desta espécie de roedor apresentaram uma similaridade aproximadamente de 73.0% com a sequência U34248 do vírus Oliveros da região central da Argentina, cujo reservatório é o roedor *N. benefactus*.

Quadro 5.1. Resumo dos resultados obtidos na análise molecular e sequenciamento dos roedores dos municípios de Sidrolândia e Dois Irmãos do Buriti - MS.

Dados gerais dos roedores				RT- PCR		Sequenciamento	
Numeração	Espécie	Sexo	Ponto de Captura	GPC	NP	Sequencia parcial	Resultado Final
LBCE 8672	<i>C. callosus</i>	M	CG13	POS	POS	GPC/NP	LATV
LBCE 8673	<i>C. callosus</i>	M	CG26	POS	POS	GPC/NP	LATV
LBCE 8674	<i>C. callosus</i>	M	CG17	POS	POS	GPC/NP	LATV
LBCE 8675	<i>C. callosus</i>	M	CG28	POS	POS	GPC/NP	LATV
LBCE 8679	<i>C. callosus</i>	M	C02	POS	NEG	NP	LATV
LBCE 8680	<i>C. callosus</i>	M	C10	POS	POS	GPC	LATV
LBCE 8684	<i>N. lasiurus</i>	M	CG07	POS	NEG	GPC	OLVV
LBCE 8689	<i>N. lasiurus</i>	F	CG30	POS	NEG	Segmento S completo	OLVV
LBCE 8693	<i>C. callosus</i>	M	CG25	POS	NEG	GPC/NP	LATV
LBCE 8695	<i>C. callosus</i>	F*	CG15	POS	POS	GPC/NP	LATV
LBCE 8696	<i>C. callosus</i>	M	CG27	POS	POS	GPC	LATV
LBCE 8699	<i>C. callosus</i>	M	CG30	POS	POS	GPC/NP	LATV
LBCE 8701	<i>C. callosus</i>	M	C16	POS	NEG	GPC	LATV
LBCE 8710	<i>N. lasiurus</i>	M	CG17	POS	POS	GPC	OLVV
LBCE 8721	<i>C. callosus</i>	M	CG08	POS	POS	GPC/NP	LATV
LBCE 8722	<i>C. callosus</i>	M	CG38	POS	NEG	GPC	LATV
LBCE 8723	<i>C. callosus</i>	M	CG25	POS	NEG	GPC	LATV
LBCE 8726	<i>C. callosus</i>	F*	CG40	POS	POS	Segmento S completo	LATV
LBCE 8729	<i>C. callosus</i>	M	D32	POS	NEG	GPC	LATV
LBCE 8731	<i>C. callosus</i>	M	CG39	POS	NEG	GPC	LATV
LBCE 8734	<i>C. callosus</i>	M	CG18	POS	NEG	GPC	LATV
LBCE 8793 ⁺	<i>C. callosus</i>	M	B02	POS	NEG	GPC	LATV

+ = roedor do município de Dois Irmãos do Buriti; * Fêmea grávida; (F = fêmea /M = macho; POS= positivo/NEG = negativo; LATV = vírus Latino OLVV= vírus Oliveros).

Quadro 5.2. Resumo dos resultados obtidos na análise molecular e sequenciamento dos roedores do município de Cassilândia - MS.

Dados gerais dos roedores					RT- PCR		Sequenciamento	
Numeração	Espécie	Sexo	Ponto de Captura	Data de captura	GPC	NP	Sequência parcial	Resultado Final
LBCE 11785	<i>N. lasiurus</i>	M	G20	30-Jul-08	POS	POS	NEG	NEG
LBCE 11788	<i>N. lasiurus</i>	F	G06	30-Jul-08	POS	NEG	GPC	OLVV
LBCE 11792	<i>N. lasiurus</i>	M	G16	31-Jul-08	POS	POS	NEG	NEG
LBCE 11809	<i>N. lasiurus</i>	M	G01	31-Jul-08	POS	NEG	GPC	OLVV
LBCE 11812	<i>N. lasiurus</i>	M	G06	31-Jul-08	POS	NEG	NEG	NEG
LBCE 12030	<i>C. expulsus</i>	F	B07	11-Oct-08	POS	POS	NEG	NEG
LBCE 12039	<i>N. lasiurus</i>	M	G18	11-Oct-08	POS	POS	GPC	OLVV
LBCE 12042	<i>N. lasiurus</i>	F	G05	11-Oct-08	POS	NEG	GPC	OLVV
LBCE 12092	<i>N. lasiurus</i>	F	G07	12-Oct-08	POS	NEG	NEG	NEG
LBCE 12104	<i>N. lasiurus</i>	M	G01	13-Oct-08	POS	NEG	GPC	OLVV
LBCE 12109	<i>N. lasiurus</i>	M	B02	13-Oct-08	POS	NEG	NEG	NEG
LBCE 12122	<i>N. lasiurus</i>	M	G29	14-Oct-08	POS	NEG	NEG	NEG
LBCE 12123	<i>N. lasiurus</i>	F	G30	14-Oct-08	POS	NEG	GPC	OLVV

(F = fêmea /M = macho; POS= positivo/NEG = negativo; LATV = vírus Latino OLVV= vírus Oliveros)

A diferença de aminoácidos da proteína GPC entre os vírus obtidos de *C. callosus* e *N. lasiurus* variaram de 32.9 a 39.5%.

Devido à incompatibilidade dos resultados encontrados na amplificação dos diferentes genes que constituem o segmento S dos arnavírus, só foram considerados positivos os roedores dos quais foi possível o sequenciamento dos produtos da RT-PCR para a GPC ou NP conforme descrito nos quadros 5.1 e 5.2. Sendo assim, um total de 27 roedores foram positivos, com uma prevalência de 21.6% na população de estudo. As demais prevalências calculadas se encontram na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Prevalência molecular da infecção por arnavírus em roedores silvestres das espécies *C. callosus* e *N. lasiurus* capturados no estado do Mato Grosso do Sul

Município	<i>C. callosus</i>	<i>N. lasiurus</i>	Total
	POS/TOTAL(PREV %)	POS/TOTAL(PREV %)	POS/TOTAL(PREV %)
Sidrolândia	18/27 (66.6%)	3/21 (14.2%)	21/48* (43.75%)
Dois Irmãos do Buriti	1/1 (100%)	-----	1/3* (33.3%)
Cassilândia	-----	5/45 (11.1%)	5/74* (6.7%)
Prevalência por espécie	19/28 (67.8%)	8/76 (10.5%)	27/125** (21.6%)

* total dos animais analisados por município incluindo outras espécies não discriminadas na tabela

** total dos animais incluídos no estudo (POS = positivo) (PREV= prevalência)

5.3.3. Sequenciamento completo do segmento S dos Arnavírus

Com oligonucleotídeos específicos, desenhados neste estudo para amplificação do segmento S dos arnavírus da Clade C (seção 4.4), foi possível sequenciar o segmento S completo de um representante de cada espécie de roedor positivo. A análise do segmento S do vírus obtido do roedor *N. lasiurus* e *C. callosus* mostrou, respectivamente, um tamanho de 3,545nt e 3,397nt de extensão. Resultados de análises de similaridade das NP e GPC do vírus de *N. lasiurus* demonstraram as menores diferenças 11.2% e 16,4% com o vírus Oliveros (U34248). As proteínas do vírus de *C. callosus* foram mais próximas ao vírus Latino variante MARU (AF512830), 10.0% (NP) e 11.3% (GPC). Estes dados reforçam aqueles obtidos com a análise das sequências parciais do segmento S.

5.3.4. Análise filogenética

Com o objetivo de melhor compreender as relações de parentesco e distribuição dos vírus detectados no estado do Mato Grosso do Sul, foram construídos dendogramas para a análise das relações filogenéticas entre as sequências obtidas neste estudo e as demais espécies de arenavírus descritas na literatura.

5.3.4.1. Análise Filogenética da proteína GPC (Parcial)

A árvore filogenética gerada com as sequências parciais da proteína GPC corroborou com os dados obtidos com a matriz de similaridade e confirmou que as sequências obtidas dos roedores do MS pertencem à clade C dos arenavírus do NM.

As sequências de aminoácidos obtidas de *N. lasiurus* e *C. callosus* formaram um clado monofilético bem definido com os vírus Oliveros e Latino, respectivamente. Observou-se também que não houve distinção na relação filogenética entre as sequências recuperadas de diferentes municípios (Figura 5.1). Os roedores LBCE 8701, LBCE 11788 não foram utilizados nessa análise, por apresentarem sequências com número menor de nucleotídeos que as demais.

5.3.4.2. Análise Filogenética da proteína NP (Parcial)

A árvore filogenética gerada com as sequências parciais da NP apresentou um perfil semelhante ao encontrado para a proteína GPC, no qual, novamente, os vírus deste estudo se agruparam com os vírus pertencentes à clade C dos arenavírus do NM.

Não foi possível obter sequências da NP do único roedor positivo de Dois Irmãos do Buriti e, sendo assim, as comparações de NP dos vírus de *C. callosus* foram restritas ao município de Sidrolândia.

A sequência de NP do roedor LBCE 12039 foi obtida com os primer desenhados para o sequenciamento completo (1510-1528F e 2385-2364R). Mais uma vez as amostras de vírus obtidas de *N. lasiurus* não apresentaram uma separação por localidade (Figura 5.2).

5.3.4.3. Análise Filogenética das proteínas GPC E NP Completas

As sequências completas do segmento S de um exemplar de cada vírus detectado no município de Sidrolândia foram amplificadas utilizando os oligonucleotídeos desenvolvidos neste trabalho (seção 4.4). As análises filogenéticas das proteínas completas codificadas pelo

segmento genômico S não demonstraram nenhuma possível recombinação entre esses arenavírus e reforçaram a posição desses vírus na Clade C do NM.

As proteínas GPC (Figura 5.3) e NP (Figura 5.4) de *N. lasiurus* e *C. callosus*, assim como as parciais, formaram um grupo monofilético bem definido com ótimo suporte, com os vírus Oliveros e Latino.

5.3.4.4. Análise Filogenética da proteína NP dos *Arenavirus* da Clade C do Novo Mundo

Para avaliar a posição dos vírus identificados em *N. lasiurus*, quanto à possibilidade de ser uma nova espécie do gênero ou de uma variante viral, foi realizada uma análise filogenética com sequências parciais de aminoácidos da NP das amostras de Sidrolândia e de outras variantes virais relacionadas à Clade C. Observou-se que as sequências de *N. lasiurus* estão próximas ao vírus Oliveros e à variante viral desse vírus (vírus Pampa), também recuperada de um roedor do gênero *Necromys* spp. na Argentina. Curiosamente, o vírus Pinhal obtido de *C. tener* no estado de São Paulo, também relacionado aos vírus da Clade C, se apresenta filogeneticamente mais próximo ao vírus Oliveros (Figura 5.5).

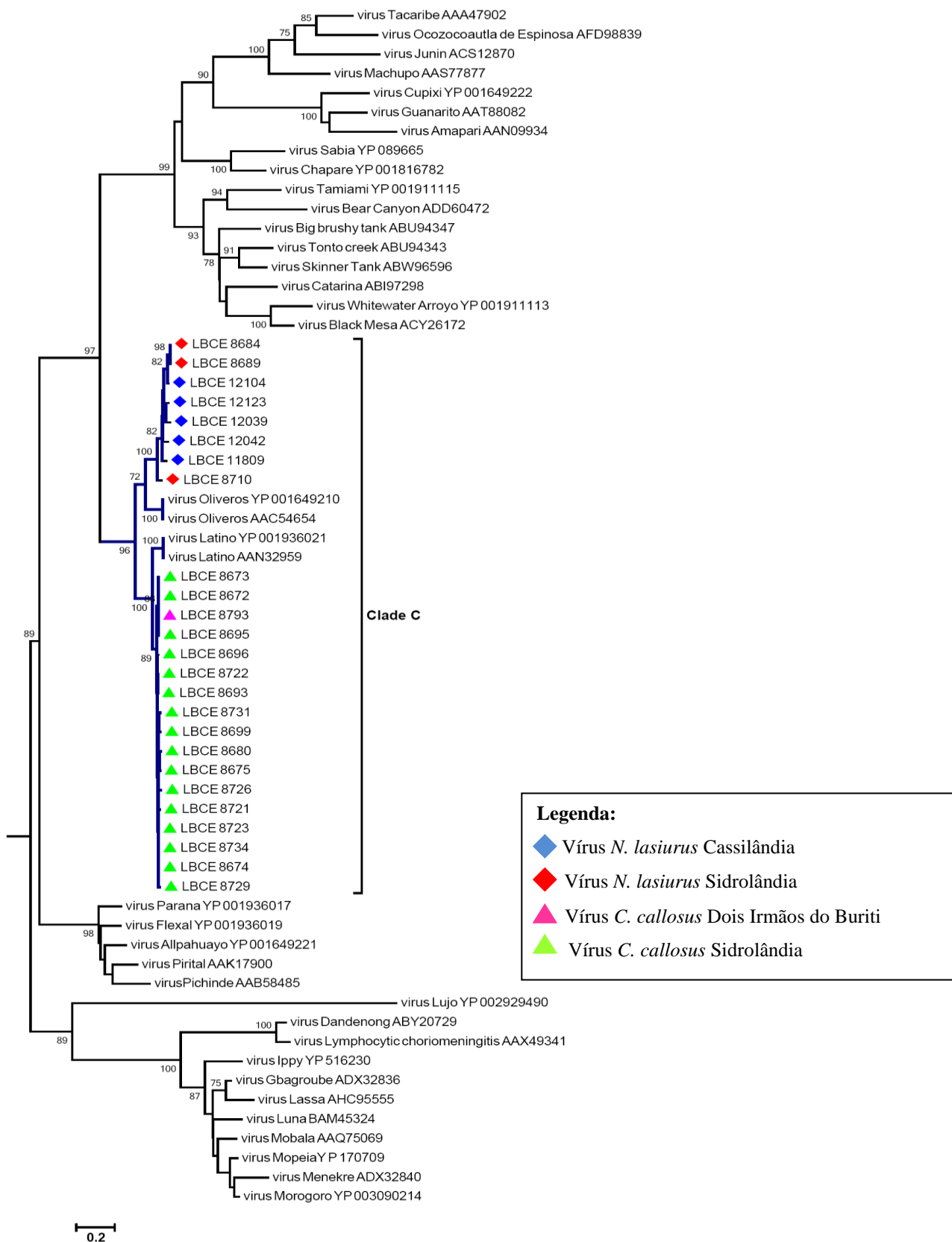


Figura 5.1. Relações filogenéticas das sequências parciais da proteína GPC (313 aa) dos arenavírus recuperados em roedores de Mato Grosso do Sul. A análise foi construída por Máxima verossimilhança implementada no programa MEGA versão 5.2 utilizando o modelo Jones Taylor Thorton (JTT) + G. A barra de escala indica a divergência das sequências. Os valores numéricos nos nós da árvore indicam o valor de *Bootstrap*.

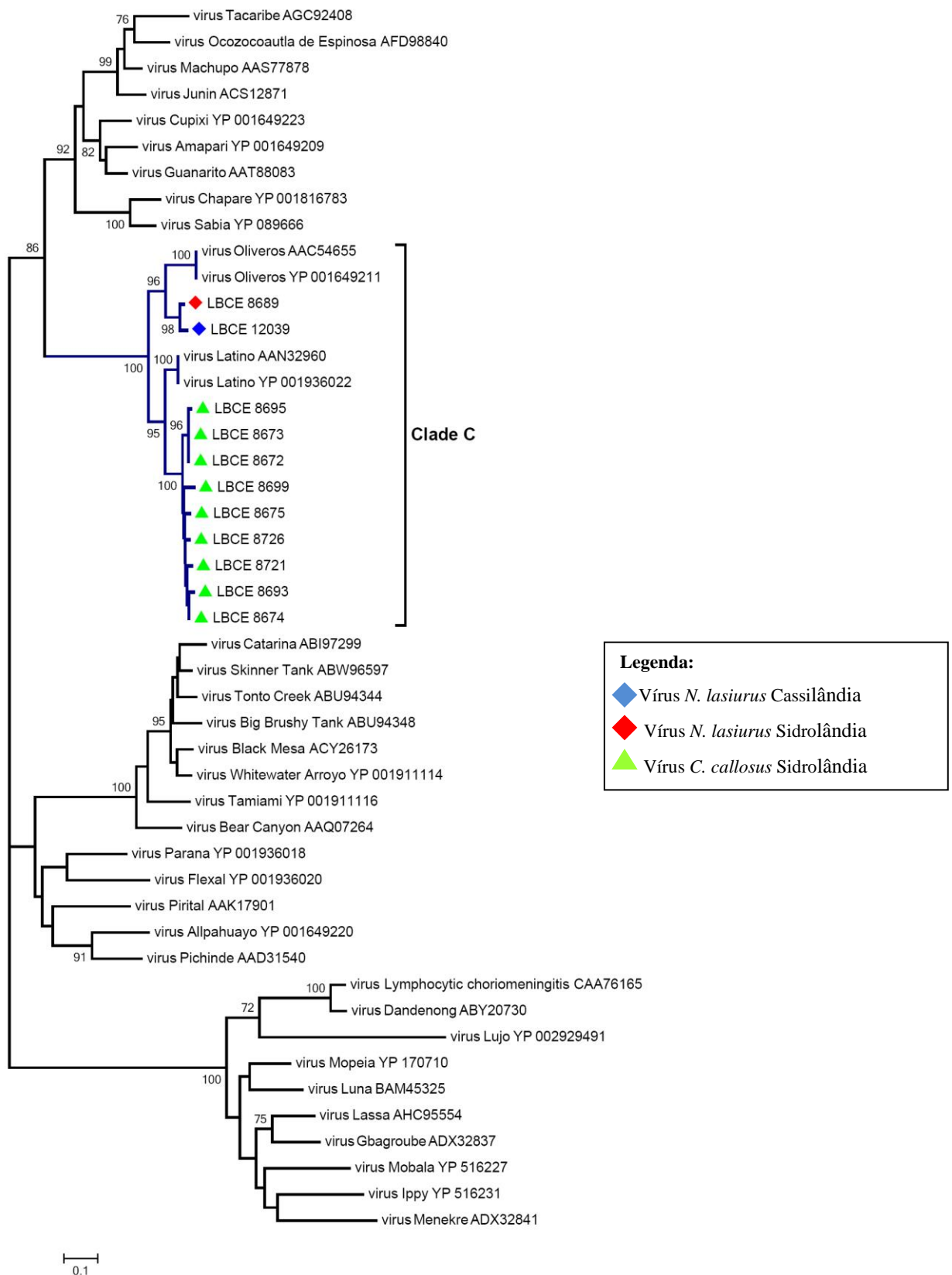


Figura 5.2. Relações filogenéticas das sequências parciais da proteína NP (153 aa) dos arenavírus recuperados em roedores de Mato Grosso do Sul. A análise foi construída por Máxima verossimilhança implementada no programa MEGA versão 5.2 utilizando o modelo Jones Taylor Thorton (JTT) + G. A barra de escala indica a divergência das sequências. Os valores numéricos nos nós da árvore indicam o valor de *Bootstrap*.

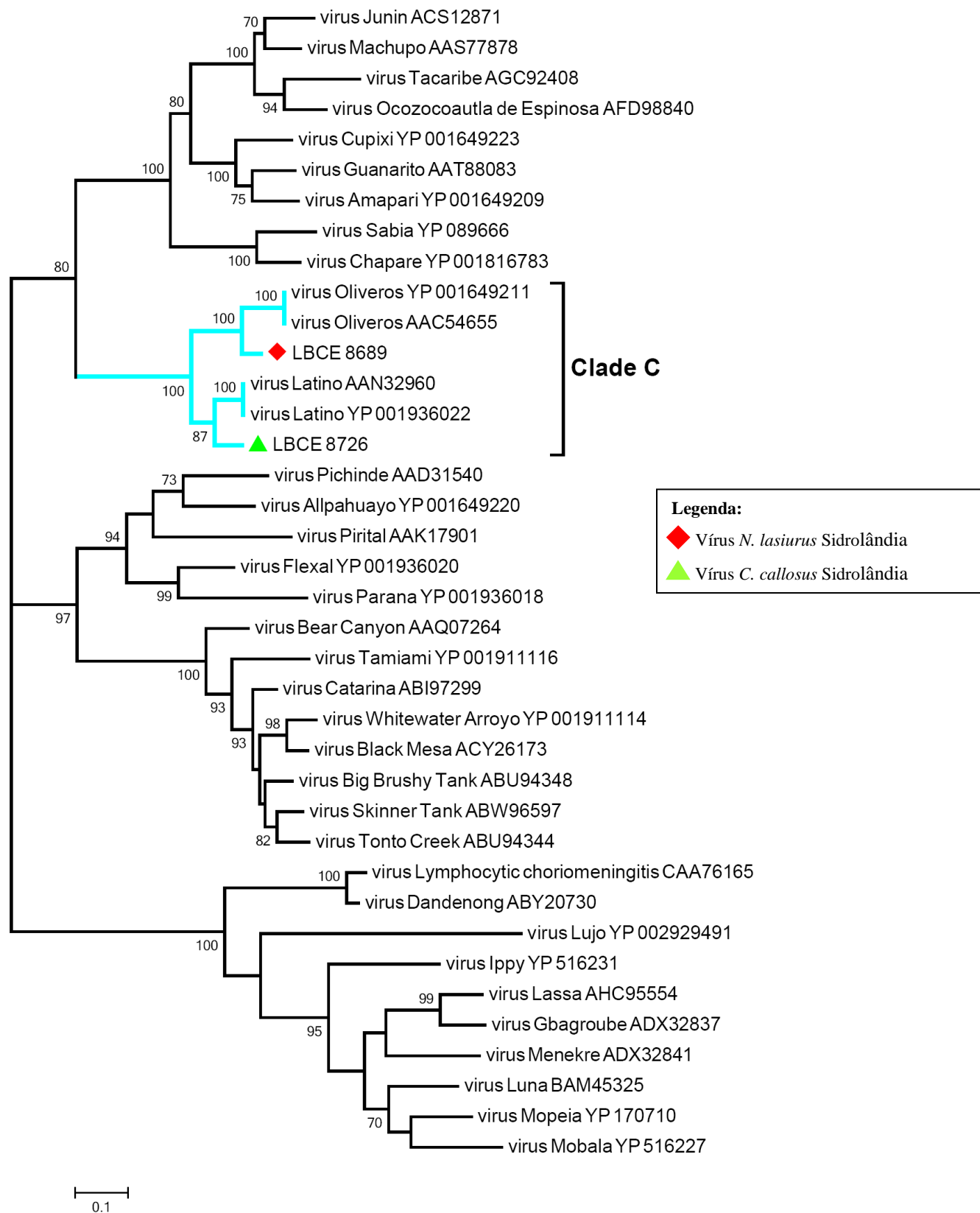


Figura 5.4. Relações filogenéticas das seqüências parciais da proteína NP (571aa) dos arenavírus recuperados em roedores de Mato Grosso do Sul. A análise foi construída por Máxima verossimilhança implementada no programa MEGA versão 5.2 utilizando o modelo Jones Taylor Thorton (JTT) + G. A barra de escala indica a divergência das seqüências. Os valores numéricos nos nós da árvore indicam o valor de *Bootstrap*.

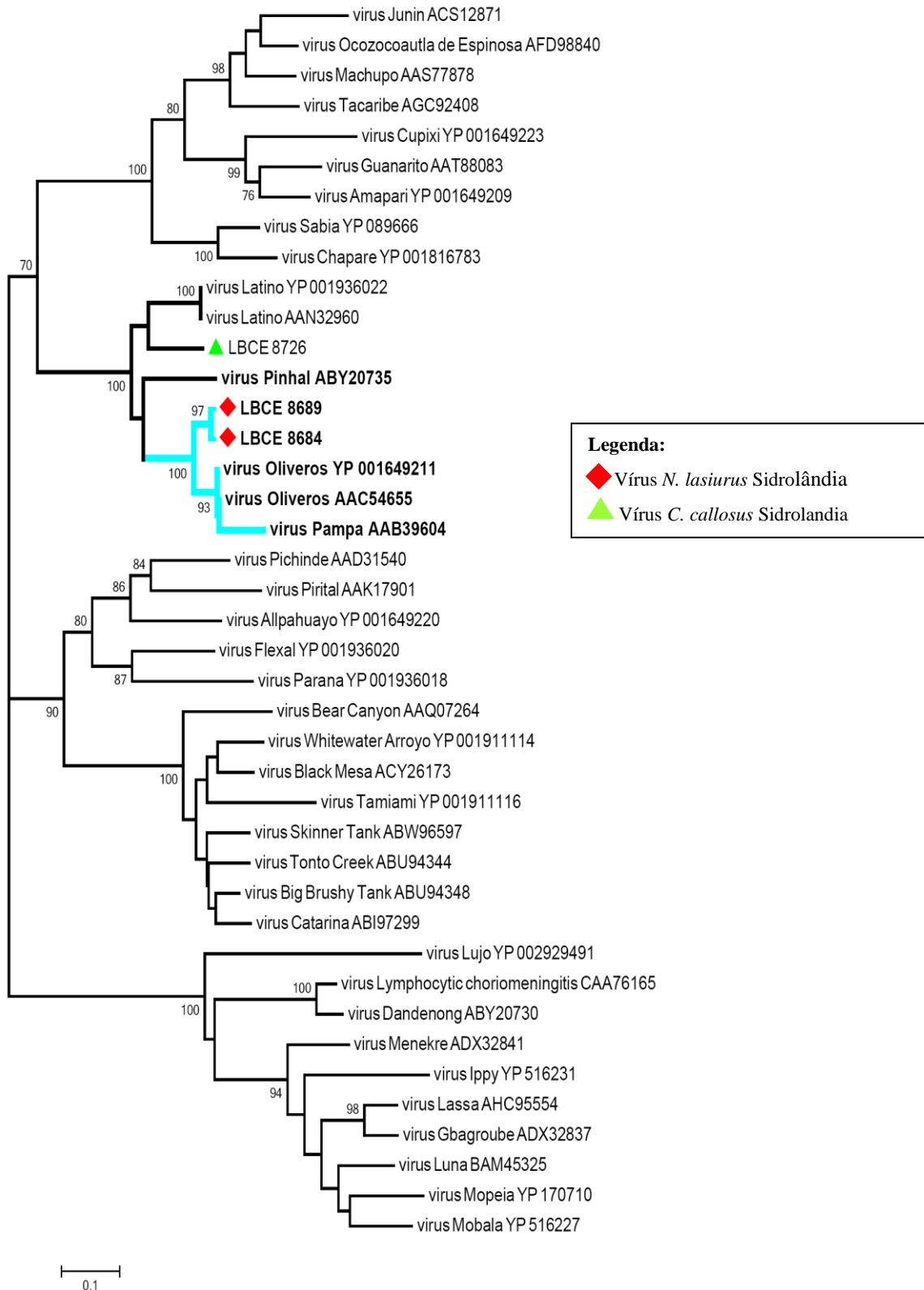


Figura 5.5. Relações filogenéticas das sequências parciais da proteína NP (175aa) dos arenavírus recuperados em roedores de Mato Grosso do Sul. A análise foi construída por Máxima verossimilhança implementada no programa MEGA versão 5.2 utilizando o modelo Jones Taylor Thorton (JTT) + G. A barra de escala indica a divergência das sequências. Os valores numéricos nos nós da árvore indicam o valor de *Bootstrap*.

6- DISCUSSÃO

6.1. Identificação da infecção por *Arenavirus* em profissionais que manuseiam animais

Embora existam poucos estudos sobre o risco ocupacional envolvendo diferentes categorias de profissionais que trabalham com zoonoses associadas com roedores silvestres, a adoção de medidas de biossegurança no manuseio de roedores potencialmente infectados por arenavírus tem sido preconizada, em especial nas regiões onde sabidamente roedores silvestres infectados por arenavírus têm sido identificados (Fritz et al. 2002).

No Brasil, até o momento, cinco espécies de arenavírus foram descritas: (i) vírus Amapari isolado de duas espécies de roedores *Neacomys guinea* e *Oryzomys capito*, (ii) vírus Cupixi (*Oryzomys capito*), (iii) vírus Flexal (*Oryzomys* sp.), (iv) vírus Pinhal (*Calomys tener*) e (v) vírus Sabiá (Pinheiro et al. 1966, 1977, Coimbra et al. 1994, Charrel et al. 2002, Charrel & de Lamballerie 2010). O único estudo de soroprevalência de arenavírus realizado na população brasileira envolveu indivíduos com quadros febris sem etiologia definida no estado do Mato Grosso e demonstrou que 1.4% destes pacientes possuíam anticorpos anti-arenavírus (Machado et al. 2010). Neste cenário, o Brasil se destaca na América do Sul como o país com o maior número de espécies de arenavírus descritas, mas contraditoriamente com pouco conhecimento sobre a distribuição geográfica e a dinâmica desses vírus em seus reservatórios e, principalmente, entre a população humana.

Este estudo foi realizado com uma população com história de contato direto com animais silvestres e o seu habitats, fato que, conseqüentemente, possibilita considerar, assim, esta população como de alto risco para infecção por arenavírus, especialmente os 246 profissionais que relataram atividades associadas com captura de animais silvestres.

Como os profissionais referiam atividades de captura em todos os estados do Brasil, é possível, guardando aos devidos limites do estudo, demonstrar a abrangência territorial deste estudo. Majoritariamente constituído por mulheres, entre 18 e 26 anos de idade, os profissionais relataram atividades relacionadas ao contato direto com animais silvestres como a captura e necropsia, principalmente de roedores, marsupiais e ou morcegos, por um período de, no mínimo, um ano. Embora mais da metade dos participantes (57.2%) 167/292 tenham informado que utilizavam equipamentos de proteção individual durante a realização das atividades associadas aos animais, os mesmos se restringiam, na maioria das vezes, a luvas e botas, fato que reforça a vulnerabilidade destes profissionais sob o ponto de vista da biossegurança e o risco de infecção por arenavírus.

Das 292 amostras analisadas, duas (0.7%) apresentaram sororeatividade para arenavírus. Este resultado está em consonância com os dados disponíveis na literatura científica, na qual se tem comprovado que a transmissão de arenavírus, assim como a de outros vírus associados a roedores, é um evento raro entre profissionais que têm elevada exposição a estes vírus. Apesar do consenso na literatura sobre o risco potencial da infecção por arenavírus em atividades relacionadas a animais, poucos são os estudos que descrevem a soroprevalência das arenaviroses nas populações potencialmente expostas aos roedores infectados por arenavírus (Fritz et al. 2002).

Fulhorst e colaboradores (2007) em seus estudos envolvendo profissionais que manuseavam roedores nos EUA encontraram uma sororeatividade de 0,3% entre os 757 participantes, reforçando a ideia de que entre profissionais que trabalham especificamente apenas com roedores a prevalência de anticorpos para esse vírus é baixa.

A população deste estudo foi composta predominantemente por profissionais com faixa etária mais baixa e o período de tempo de manuseio e o tipo de contato com animais foram variados, com o predomínio de períodos menores que dois anos. Na literatura, em um estudo similar realizado em profissionais que trabalham com captura de pequenos mamíferos, foi possível demonstrar um aumento da sororeatividade de acordo com os anos de trabalho dos profissionais, com estabilização depois de 10 anos de atividades (Brummer-Korvenkontio et al. 1982), fato que reforça a baixa prevalência encontrada neste estudo, já que a maioria dos participantes não relatava atividades com animais por um período de tempo superior a dois anos.

Embora seja uma população de estudo distinta, um levantamento feito em pacientes de um hospital em Birmingham, Alabama observou-se que a soropositividade para arenavírus aumenta de acordo com a faixa etária e que prevalências de 5.1% podem ser encontradas em populações de 30 anos ou mais, reforçando a questão da idade (Stephensen et al. 1992).

Neste estudo dois dos 292 profissionais foram sororeativos. A estudante de 22 anos do curso de gestão ambiental, do estado do Paraná relatava como atividade necropsia de aves e de mamíferos capturados na Mata Atlântica nos últimos dois anos. Mesmo na ausência de registro de circulação de arenavírus no estado do Paraná, não é improvável que a infecção tenha ocorrido no estado durante as atividades de campo, considerando a proximidade com os estados de São Paulo e de Mato Grosso do Sul, onde arenavírus comprovadamente circulam. Apesar da correlação negativa entre o uso de EPIs e o sexo feminino, a participante relatava a utilização de luvas e botas de borracha em todas as atividades envolvendo os animais.

O segundo participante sororeativo foi um homem de 30 anos, biólogo, residente no estado de São Paulo, mas com um rico histórico de viagens para os estados de São Paulo,

Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Rio de Janeiro e Espírito Santo, além de Moçambique, num período de oito anos. O histórico de viagem desse participante dificulta a identificação do possível local de infecção, mas seu histórico inclui estados brasileiros onde a presença de arenavirus já foi confirmada: Pará (Pinheiro et al. 1966). Mato Grosso do Sul (presente estudo) e São Paulo (Coimbra et al. 1994). Como ressaltado previamente, o único arenavirus naturalmente patogênico reconhecido até o momento em nosso país, o SABV, foi descrito no estado de São Paulo. A dificuldade de se identificar o provável local de infecção é reforçada considerando que, as reatividades entre antígenos dos arenavirus do NM e do VM são fracas ou mesmo inexistentes e que não existem estudos sobre a circulação de arenavirus em quatro estados (ES, MG, PR e RJ), além de Moçambique (Sanchez et al. 1989, Ruo et al. 1991), assim, como o paciente realizou atividades no continente africano, a possibilidade de contato com arenavirus do VM não pode ser descartada.

Nenhum dos profissionais sororeativos relatou quadro febril e/ou doença grave durante a manipulação dos animais. Estudos de soroprevalência em regiões endêmicas têm demonstrado que a população dessas regiões apresenta um número pequeno de indivíduos com soroconversão sem um história de manifestações clínicas (Weissenbacher et al. 1987, Tesh et al. 1993), o que pode indicar que as infecções por arenavirus, geralmente resultam em doença, reforçando também o conceito de que a infecção humana é um evento raro. Apesar do desconhecimento da interação arenavirus e hospedeiro, sabe-se, no entanto, que infecções pelo vírus Pinchidé, um arenavirus da Colômbia, causa soroconversão sem sinais aparentes de doença (Buchmeier et al. 1974) e que o vírus LCMV também tem sido responsável por doenças brandas semelhantes a um resfriado sem maiores complicações (Amman et al. 2007, Buchmeier et al. 2007).

Nos estudos consultados, foi possível identificar um único inquérito sorológico realizado no Brasil visando à pesquisa de arenavirus. Semelhante aos nossos achados, Machado e colaboradores encontraram uma prevalência de 1.4% em uma população composta por indivíduos que apresentavam um quadro febril agudo, sem etiologia definida, de Nova Xantina, no estado do Mato Grosso, fato que leva a crer que os indivíduos tenham apresentado possivelmente uma infecção oligossintomática seguida de soroconversão, assim como os profissionais incluídos no presente estudo (Machado et al. 2010).

Considerando que as amostras dos profissionais foram submetidas previamente à pesquisa de anticorpos anti-hantavirus e que a soroprevalência foi de 0.3%, é oportuno ressaltar que esses dados demonstram o quanto a presença dos arenavirus pode estar sendo subestimada em nosso país. Os arenavirus determinaram uma soroprevalência ligeiramente maior do que a encontrada para os hantavirus, um vírus com características semelhantes as dos

arenavírus, tanto quanto à forma de transmissão quanto à participação de roedores silvestres nos ciclos enzoóticos (Mills & Childs 1998).

Em adição, é digno de nota alertar para a possibilidade de que estes profissionais possam estar expostos a roedores infectados por arenavírus em qualquer região do território brasileiro, considerando os diferentes biomas existentes no Brasil que abrigam 71 gêneros, e 235 espécies de roedores, com 117 espécies pertencentes à subfamília *Sigmodontinae*, na qual se encontram os reservatórios de hantavírus e arenavírus (Oliveira & Bonvicino 2006).

Em nosso estudo, a infecção dos profissionais pode ter ocorrido provavelmente a partir da inalação de aerossóis durante as atividades de campo, uma vez que nenhum dos indivíduos relatou utilizar EPIs relacionados com a proteção contra agentes de transmissão por via aérea como máscaras de cobertura facial total e respirador autônomo motorizado com pressão positiva (Kelt & Hafner 2010).

A baixa prevalência, identificada em profissionais frequentemente expostos neste e também nos demais estudos realizados em diferentes regiões do Mundo, seria provavelmente decorrente das condições do material manuseado assim como do tipo de procedimentos realizados, já que a maioria dos profissionais não realiza necropsia e que o material, no momento do processamento, se encontra, quase que invariavelmente úmido, dificultando, assim, a geração de aerossóis contendo partículas virais. No entanto, recentemente, Torres-Pérez e colaboradores (2010) relataram dois casos de síndrome pulmonar por hantavirus em profissionais que trabalhavam no campo, possivelmente, associado à mordida de roedor, reforçando assim, a hipótese, também para arenavírus, de que o risco possa não estar associado exclusivamente à inalação de partículas aerolizadas. Mordida, contato de lesões de descontinuidade da pele com excretas infectadas e a acidentes envolvendo perfuro cortantes e materiais infectados devem também ser considerados. Estes achados reforçam a necessidade da realização de estudos de desenho longitudinal na tentativa de acompanhar grupos de profissionais com atividades associadas ao manuseio dos animais silvestres, buscando avaliar inclusive os cuidados a serem adotados referentes à biossegurança nas diferentes atividades realizadas por estes profissionais.

Em relação à sensibilidade e especificidade do teste sorológico ELISA, estudos realizados na Argentina para avaliar a sua performance em comparação com o teste de neutralização por redução em placa (PRNT) demonstram que o teste apresenta altos valores de especificidade (98.8 a 100%) e sensibilidade (95.6%), sendo muitas vezes, o teste sorológico de escolha pela “facilidade” de execução e bons resultados principalmente quando utilizado em diluições maiores ou iguais a 1:800 (García Franco et al. 1988, Riera et al. 1997). Mas como já foi discutido anteriormente, a especificidade antigênica relacionada a algumas

espécies virais dificulta a identificação de um teste sorológico com uma antígeno capaz de ser utilizado como instrumento para realização de inquéritos. Em nosso estudo utilizamos o JUNV, um arenavírus da América do Sul, em amostras de soro com baixa diluição, nossa intenção era aumentar a sensibilidade, uma vez que devido à especificidade antigênica deste vírus, poderia se perder resultados positivos para outras espécies de arenavírus. Apesar de não ser o ideal, estudos envolvendo as espécies detectadas no Brasil e suas propriedades antigênicas precisam ser analisadas para a padronização de um teste específico para o nosso território, ou testes específicos para determinadas regiões do país.

6.2. Identificação da infecção por *Arenavirus* em casos suspeitos de dengue do Mato Grosso do Sul

O estado do Mato Grosso do Sul possui um grande número de doenças endêmicas e, entre elas, a dengue, que, em momentos de epidemia, pode ser confundida com casos de arenavirose, como ocorrido na Venezuela, onde, aproximadamente, 26% dos casos de arenavirose foram classificados inicialmente como dengue, mesmo depois da descrição da FHV (Salas et al. 1991). Além da dengue, o diagnóstico diferencial deve incluir outras doenças endêmicas que ocorrem na América do Sul, principalmente as FHV pelos vírus da febre amarela e hantavirose, além de doenças parasitárias como a malária, assim como foi o reconhecimento do primeiro e único caso de FHB, causada pelo vírus Sabiá, cujo diagnóstico inicial foi de febre amarela (Coimbra et al. 1994).

Em nosso estudo retrospectivo, a análise das amostras de pacientes suspeitos de dengue procedentes do estado do Mato Grosso do Sul, onde, em 2007, foram notificados 70.272 casos suspeitos de dengue, com 44.550 na capital Campo Grande, foi negativa para infecção por arenavírus. Todos os indivíduos dessa população eram residentes do município de Campo Grande, um município com uma extensão territorial de 8.092,951 km² e uma densidade populacional de 97.22 hb/km². Como os pacientes exerciam atividades administrativas, empresariais ou de ensino, provavelmente com pouco contato com roedores, os dados epidemiológicos não foram compatíveis com o perfil de população com risco de infecção por arenavírus, apesar do quadro clínico sugestivo. A maioria dos casos de arenavirose ocorre principalmente em homens, adultos jovens, com atividades relacionadas a atividades agrícolas ou atividades outras que propiciem o contato com roedores silvestres.

Embora a pesquisa de arenavírus nas amostras tenham se mostrado negativa, o pequeno número de amostras de casos suspeitos de dengue que foram analisadas, assim como a baixa incidência das arenavirose, como observado em outros países latino-americanos,

(Manziona et al. 1995), interferem na interpretação do resultado e apontam para a necessidade de se incluir o diagnóstico de arenavirose, considerando sempre a possibilidade de sobreposição de casos de arenavirose em momento de epidemia de dengue. Assim, em decorrência da dificuldade de se obter, neste estudo, amostras de casos suspeitos de dengue procedentes de MS, em especial das regiões onde foram identificados roedores infectados por arnavírus, somente com uma vigilância continuada e um maior número de amostras, será possível verificar a circulação de arnavírus em nosso território.

Ainda neste contexto de inclusão do diagnóstico das arenavirose, é pertinente considerar o fato de que os vírus detectados no presente estudo não têm sido considerados patogênicos, até a presente data, e que, de forma intrigante, os vírus OLV e LAT membros da Clade C do NM utilizam os mesmo receptores celulares que os arnavírus do VM, LASV e LCMV(Cao et al. 1998, Spiropoulou et al. 2002). Esta interação diferente da observada com os arnavírus do NM permite especular sobre a possibilidade, caso estes arnavírus sejam capazes de infectar o homem e produzir doença, de que a manifestação clínica seja semelhante à febre do Lassa ou coriomeningite linfocítica. É pertinente lembrar que a febre do Lassa clinicamente se assemelha à dengue, com a única diferença de apresentar alta letalidade relacionada com a presença de hemorragias (Günther et al. 2000, Macher & Wolfe 2006).

Quanto ao vírus da coriomeningite linfocítica, cujo reservatório tem dispersão mundial, a investigação de casos suspeitos necessitaria de um perfil clínico que contemplasse manifestações neurológicas, em especial meningite asséptica, considerando também o diagnóstico diferencial com enterovírus, herpes simples tipo 2 e varicela-zoster, principalmente em pacientes residentes de áreas rurais e/ou com histórico de contato com roedores.

Corroborando com a afirmativa acima de que é imprescindível a inclusão da arenavirose na vigilância sindrômica das febres hemorrágicas, Coimbra e colaboradores (2001) descreveram um caso fatal causado por uma nova espécie de arnavírus geneticamente relacionado aos vírus caracterizados neste estudo (Figura 5.5.). Identificado no interior do estado de São Paulo, o vírus Pinhal foi isolado de um paciente de 32 anos que desenvolveu um quadro clínico inicial caracterizado por febre alta, mialgia, dor abdominal, náusea e vômito. O paciente evoluiu com hemoptíase, hematúria, dispnea, confusão mental e febre baixa culminando com óbito, 28 dias após o início da doença (Coimbra et al. 2001). Infelizmente, embora o agente tivesse sido isolado, a sua caracterização completa não foi realizada.

6.3. Identificação da Infecção por *Arenavirus* em roedores silvestres do estado do Mato Grosso do Sul

Um dos objetivos do presente estudo foi avaliar a presença de infecção por arenavírus em amostras de roedores silvestres do estado do Mato Grosso do Sul, um estado cujos limites geográficos fazem divisa com áreas onde casos de arenaviruses já foram confirmados como o estado de São Paulo e Bolívia. A identificação de arenavírus em 27 roedores das espécies *N. lasiurus* e *C. callosus* capturados em três diferentes municípios matogrossenses confirma a hipótese de que estes agentes virais circulam no território brasileiro.

Em relação à caracterização molecular dos arenavírus detectados neste estudo é necessário abordar e discutir alguns pontos considerados imprescindíveis para que os resultados inéditos pudessem ser obtidos, preenchendo, assim, uma importante lacuna no conhecimento deste agente zoonótico de grande complexidade taxonômica, praticamente desconhecido em nosso território.

A amplificação do fragmento referente à GPC em todas as amostras possibilitou verificar que os produtos gerados possuíam um peso molecular acima do esperado, cerca de 100 a 200 pares de base, dependendo do roedor infectado. Amostras de *N. lasiurus* apresentaram bandas em gel de agarose próximas a 1100nt enquanto amostras de *C. callosus* apresentavam *amplicons* de 1.000nt. Distinções sutis entre os produtos amplificados, utilizando outros oligonucleotídeos, já haviam sido descritas para as diferentes clades dos arenavírus do NM (Bowen et al. 1996). Essas variações se devem a grande plasticidade genética dos arenavírus, evento que torna seu genoma extremamente variável, em especial, a região da proteína GPC, que após a sua clivagem, origina proteínas de superfície responsáveis pela ligação com as células hospedeiras.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram duas regiões codificantes do segmento S dos arenavírus discordantes, consequência, provavelmente, da plasticidade genética citada anteriormente assim como da falta de disponibilidade de uma quantidade satisfatória de sequências das diferentes espécies de arenavírus e suas variantes disponíveis no Gen Bank que permitisse uma análise mais ampla com um maior número de sequências. Neste cenário, diante do escasso conhecimento sobre a real variedade genética da maioria das espécies de arenavírus no continente americano, o desenvolvimento de novas sondas genéticas para triagem de novas espécies ou mesmo de variantes de espécies se torna difícil (Charrel & Lamballerie 2010).

Ainda neste contexto, é pertinente registrar que, apesar dos iniciadores 1010C e 1696R terem sido desenvolvidos por Bowen e colaboradores (1996), com a proposta de amplificar a

região genômica referente a NP de quase todas as espécies de arenavírus reconhecidas nas Américas, 30% das amostras não puderam ser identificadas com este par de primers. Assim, diante da incapacidade de amplificar a totalidade das amostras, passou a ser imprescindível a utilização também do *set* de iniciadores descrito por Garcia e colaboradores (2000) que se mostrou, neste estudo, ser o mais adequado para identificar espécies de *Arenavirus* em roedores silvestres.

A análise das sequências nucleotídicas completas e parciais dos genes das proteínas do vírus recuperado de *C. callosus* mostrou maior proximidade, com diferença de 10.0% (NP) e 11.3 (GPC), com as do vírus Latino, variante MARU (AF512830), obtidas de roedores da espécie *C. callosus* capturados na Bolívia. Análises de similaridade das NP e GPC do vírus recuperado de *N. lasiurus* demonstraram as menores diferenças, 11.2% e 16,4%, com o vírus Oliveros (U34248) da região central da Argentina, cujo reservatório é o roedor *N. benefactus*. Ambos os vírus identificados são os únicos pertencentes à Clade C dos *Arenavirus* do NM. Estes dados confirmam a importância e a necessidade de maiores estudos sobre a circulação de arenavírus em nosso território, em especial, nas regiões limítrofes com a Argentina, Bolívia e Venezuela, cuja vigilância das febres hemorrágicas por arenavírus tem demonstrado ciclicamente a sua presença.

É pertinente considerar que a taxonomia da família Arenaviridae, ao longo dos anos, vem demonstrando diversos problemas e que não existe consenso, a medida que cada vez mais espécies vêm sendo identificadas nas últimas duas décadas. Como consequência desta complexidade taxonômica, autores têm sugerido, como critério de classificação, a utilização de um valor de corte $>12\%$ da distância p não corrigida de aminoácidos da NP em conjunto com fatores como distribuição geográfica e o reservatório natural do novo vírus (Emonet et al. 2009, Charrel & de Lamballerie 2010). Assim, apesar do vírus detectado em *N. lasiurus* no MS se enquadrar em dois critérios como uma nova espécie por: (i) possuir uma distribuição geográfica distinta (ii) estar vinculado a uma espécie de roedor reservatório diferente dos demais vírus, uma distância p não corrigida da sequência completa de aminoácidos de 11.2% observada com o OLVV, leva a concluir que não se trata de uma nova espécie viral. Adicionalmente, em consonância com os resultados relacionados com os arenavírus, uma revisão taxonômica do gênero *Necromys* spp. realizada recentemente têm-se sugerido que *N. benefactus*, reservatório do OLVV na Argentina, é na verdade um sinônimo júnior da espécie *N. lasiurus*, ou seja, *N. benefactus* e *N. lasiurus* seriam a mesma espécie de roedor (D'Elia et al. 2008).

Neste estudo, diante da complexidade taxonômica dos arenavírus, análises filogenéticas da NP foram realizadas para avaliar a posição dos vírus identificados em *N.*

lasiurus quanto à possibilidade de uma nova espécie do gênero ou de uma variante viral ou de outras variantes virais relacionadas à Clade C. Como resultado da análise foi observado que as sequências de *N. lasiurus* estavam relacionadas ao OLVV e da sua variante o vírus Pampa (Lozano et al. 1995) também recuperada de um roedor do gênero *Necromys* spp., na Argentina. Sendo assim, provavelmente o arenavírus detectado nesse estudo é uma variante distante do OLVV, reforçando a hipótese levantada por Mills e colaboradores (2007) de que OLVV estaria associado ao gênero *Necromys* spp.

Assim como os dois vírus identificados, taxonomicamente, não preenchem os requisitos de espécie determinados pelo ICTV, estes foram considerados variantes virais e receberam a nomenclatura de LATV, variante Capão Seco (vírus detectados em *C. callosus*) e de OLVV, variante Quebra-Côco (vírus detectados em *N. lasiurus*). Esses nomes foram dados pela divisão em três distritos – Capão Seco, Quebra-Côco e, a sede, Sidrolândia-, do município de Sidrolândia, onde foi identificada a cocirculação desses arenavírus.

O LATV descrito, em 1970, por Rowe e colaboradores, foi isolado do roedor *C. callosus* nos municípios de Juan Latino e San Ignacio no departamento de Santa Cruz na Bolívia. LATV, assim como os demais arenavírus do novo mundo, infecta cronicamente os roedores, principalmente aqueles que se infectam no início da vida (Webb et al. 1975b). O OLVV foi descrito em roedores silvestres, na década de 1990, na região central da Argentina, durante a vigilância eco-epidemiológica do JUNV. Seu reservatório inicialmente descrito como *Bolomys obscurus*, foi posteriormente denominado *Necromys obscurus* e, subsequentemente, *N. benefactus* (Bowen et al. 1996a, Mills et al. 1996, 2007).

Neste estudo, mais de 60% dos *C. callosus* analisados foram encontrados infectados pela variante Capão Grande, nos municípios de Sidrolândia e Dois Irmãos do Buriti, uma elevada prevalência que já foi previamente descrita com outras espécies de arenavírus nas Américas. Como exemplo, temos o estudo de soroprevalência de arenavírus do sorocomplexo Tacribe no Novo México, onde 66% de *Neotoma albigula* foram sororreativos (Cajimat et al 2007). Mais recentemente, estudos realizados em áreas endêmicas para FHV, demonstraram um prevalência de infecção pelo vírus Pirital em roedores da espécie *Sigmodon alstoni* de 64,9% (Milazzo et al. 2011).

Quanto aos resultados obtidos com os roedores capturados em Sidrolândia, 16 dos 18 *C. callosus* infectados eram machos, resultados compatíveis com os descritos na literatura, na qual é possível verificar que, na maioria das vezes, o número de machos infectados é maior do que o de fêmeas, fato relacionado aos encontros agonistas desses animais por disputa de território, comida e fêmeas (Mills et al. 1992). Apesar do baixo número de fêmeas de *C. callosus* capturadas (06), duas das três fêmeas grávidas apresentaram infecção pelo LATV

Capão Grande. Aparentemente a infecção desta espécie de roedores pelo LATV não acarreta danos na fertilidade, como relatado em infecções por outras espécies e variantes do NM assim como em roedores da mesma espécie infectados por outro arenavírus (Peters et al. 1973). Estes dados demonstram que os roedores podem desenvolver respostas distintas quando infectados por diferentes espécies de arenavírus e que é possível a transmissão vertical desses vírus para os embriões da espécie *C. callosus*, fator que corrobora para a alta prevalência de infecção nestes municípios. Nenhuma análise foi realizada com os fetos para avaliar alterações estruturais ou histopatológicas.

A presença do LATV em altas prevalências, apenas em municípios onde havia a presença do roedor *C. callosus*, mesma espécie de reservatório que na Bolívia, reforça a noção de que a maioria das espécies de arenavírus é espécie-específica e que sua distribuição está estritamente relacionada à distribuição de seu reservatório, no caso a espécie *C. callosus*. Desta forma é possível deduzir que provavelmente a área de distribuição do LATV incluía áreas secas e subúmidas do leste da Bolívia, norte da Argentina, Paraguai e no centro-oeste do Brasil onde a espécie *C. callosus* está presente.

Em relação ao OLVV, no presente estudo foi possível detectar roedores da espécie *N. lasiurus* infectados nos municípios de Cassilândia (11.1%) e Sidrolândia (14.2%). No município de Cassilândia, onde se detectou um número maior de *N. lasiurus* infectados, provavelmente pelo desenho de estudo que foi realizado neste município, foi identificado um padrão na infecção, no qual, ambos sexos apresentaram infecção na mesma proporção nos dois meses de estudo, em julho e outubro. Este mesmo padrão foi observado no único estudo sobre a dinâmica da infecção do OLVV em *N. benefactus* na Argentina (Mills et al. 2007). Considerando a importância das condições ambientais na circulação dos arenavírus, deve ser ressaltado que a captura dos roedores neste estudo ocorreu em uma área no município de Cassilândia, que foi posteriormente alagada durante o processo de implantação de hidroelétrica. Infelizmente este estudo não contemplou o período pós-alagamento para avaliar o impacto dessa mudança ambiental na dinâmica do OLVV na região.

Diante do exposto, mesmo que um estudo populacional de longo prazo não tenha sido realizado, passa ser imprescindível considerar a possibilidade de alterações na distribuição de arenavírus nas áreas sob influência de hidroelétricas, cujo impacto ambiental pode determinar o aumento da taxa de infecção entre os roedores, por conta da disputa por alimentos e espaço, com conseqüente aumento, também, do contato dos roedores infectados com a população humana. Assim, como o Rio Aporé, onde se instalou a usina, é uma importante fonte de lazer e que faz parte do roteiro de turismo ecológico e de turistas em busca de esportes radicais

como o *rafting* e a canoagem, uma vigilância deve ser implementada visando à identificação desses vírus na região.

Neste contexto, é preciso alertar que, no Brasil, o roedor *N. lasiurus* habita formações abertas e florestais do Cerrado e ao longo do ecótono Mata Atlântica-Cerrado, além de áreas de vegetação aberta no estado do Pará, e que, provavelmente, OLVV tenha a distribuição de seu reservatório e que, conseqüentemente, possa estar presente não somente no MS, mas também nos demais estados da região Centro-Oeste, leste do estado do Pará, na região nordeste, sudeste, Paraná, Santa Catarina e norte do Rio Grande do Sul (Bonvicino et al. 2008).

Assim, com o desenvolvimento deste estudo foi possível identificar, pela primeira vez, a cocirculação de LATV e OLVV em uma mesma área no Brasil. Na literatura é possível recuperar descrições de circulação de dois arenavírus em uma mesma região geográfica, geralmente envolvendo um arenavírus patogênico e, um segundo, com patogenicidade desconhecida. É o caso dos vírus GTO e Pirital na Venezuela, JUNV e Oliveros na Argentina e também entre arenavírus do VM (Fulhorst et al. 2008, Mills et al. 2007, de Bellocq et al. 2010). É imprescindível chamar a atenção para o fato de que filogeneticamente não houve sinais de recombinação entre as sequências detectadas em *C. callosus* e *N. lasiurus* no município de Sidrolândia, assim como não foram detectados eventos de troca de hospedeiro (spillover) entre os vírus.

Neste estudo os roedores infectados foram coletados, quase que em sua totalidade, em ambientes antropizados, as braquiárias na beira da estrada e as bordas de plantações, um ambiente que permite o contato do homem com roedores. O mesmo padrão foi identificado em roedores *C. musculus*, reservatório do JUNV na Argentina, onde estudos eco-epidemiológicos demonstraram predominância desta espécie de roedor em habitats lineares, como beiras de estradas, o que sugere que as infecções humanas ocorrem no contato com roedor ao longo das bordas dos campos ou beiras de estradas, ao entrar ou ao sair dos campos (Mills et al. 1992).

Por fim, embora não tenha sido a proposta deste estudo abordar aspectos econômicos e sociais, não obstante os dados apresentados anteriormente, os municípios de Sidrolândia e Dois Irmãos do Buriti apresentam características importantes relacionadas ao risco de infecção por arenavírus que precisam ser também consideradas e que serão sucintamente discutidas a seguir.

Conforme dados do Censo do IBGE 2010, o município de Dois Irmãos do Buriti possuía uma população total de 10.363 residentes, dos quais 1.246 encontravam-se em situação de extrema pobreza. Deste total dos habitantes considerados extremamente pobres,

996 (79.9%) viviam no meio rural e 250 (20.1%) no meio urbano, com 100% sem acesso à rede de esgoto ou fossa séptica, 1.034 (83.0%) sem coleta de lixo e 212 (17.1%) residindo em casas sem paredes externas de alvenaria. Situação semelhante também observada no município de Sidrolândia, onde 4.202 habitantes encontravam-se em situação de extrema pobreza. Do total dos extremamente pobres, 2.490 (59.3%) viviam no meio rural, 397 pessoas (9.4% do total) viviam sem luz, 309 (7.4%) não contavam com captação de água adequada em suas casas, 3.778 (89.9%) não tinham acesso à rede de esgoto ou fossa séptica e 2.490 (59,3%) não tinham o lixo coletado e 825 (19.6%) não tinham em suas casas paredes externas construídas em alvenaria. Além deste cenário favorável ao roedor, decorrente da presença do lixo e da ausência de parede de alvenaria nas moradias, a existência de grandes áreas agrícolas nestes municípios reforça a possibilidade de maior contato da população com roedores infectados por diferentes espécies de arenavírus, reconhecidamente patogênicos ou não para a população humana. Assim, embora nenhum dos arenavírus detectados neste estudo, até a presente data, tenha sido considerado patogênico, a possibilidade de infecção da população desses municípios pelos arenavírus identificados ou mesmo outros não deve ser descartada.

Em resumo, o encontro de resultados semelhantes aos descritos na literatura reforça a importância deste estudo, cujo desenvolvimento possibilitou a identificação de dois arenavírus sem descrição prévia em nosso país. A cocirculação de dois vírus da clade C do NM assim como a alta prevalência de infecção do LATV em *C. callosus* demonstram a importância de estudos envolvendo os arenavírus não somente no estado do MS, mas também em todo território nacional, para que se possa compreender a dinâmica dos arenavirus no nosso território e, assim, implementar medidas de vigilância e controle dessa zoonose de elevada letalidade.

7- CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos no inquérito sorológico (prevalência de 0.7%) nos profissionais que manuseiam animais confirmam o baixo risco de transmissão de arenavírus nesta população com elevada exposição, confirmando, assim, os dados da literatura sobre o assunto;
- Um número considerável de profissionais não tem o cuidado de usar equipamentos de proteção individual, com uma correlação maior com profissionais do sexo feminino.
- Não foi detectada a infecção ou contato prévio com arenavírus nas amostras de pacientes com suspeita de dengue, com ou sem confirmação laboratorial, procedentes do estado do Mato Grosso do Sul. Contribuíram para isso, além do perfil de baixa prevalência e incidência da doença, o número pequeno de amostras incluídas no estudo e do perfil dos indivíduos incluídos no estudo.
- As altas prevalências de infecção por arenavírus em roedores nos municípios de Sidrolândia, Cassilândia e Dois Irmãos do Buriti confirmam a hipótese de circulação de arenavírus em áreas onde os roedores reservatórios se encontram distribuídos e apontam para a importância da vigilância epidemiológica para os arenavírus considerados patogênicos para o homem;
- O sequenciamento de nucleotídeo do segmento S completo possibilitou a identificação de dois vírus, sem descrição prévia no Brasil, os vírus Latino em *C. callosus* e Oliveros em *N. lasiurus*;
- As altas prevalências do vírus Latino nos roedores da espécie *C. callosus* capturados em Sidrolândia e em Dois Irmãos do Buriti parece estar relacionada a uma transmissão vertical, dado concordante com a literatura;
- Com o presente estudo foi possível identificar um novo reservatório do vírus Oliveros no Brasil, o roedor da espécie *N. lasiurus*.

8- PERSPECTIVAS

- Realizar a detecção molecular de arenavírus em outras espécies de roedores silvestres da região, não incluídos neste estudo;
- Expandir o estudo realizado em roedores silvestres para outros estados do Brasil;
- Continuar a realizar o diagnóstico diferencial das arenaviroses em casos suspeitos de dengue do estado do Mato Grosso do Sul;
- Realizar parcerias para obtenção de amostras de líquido de pacientes com meningite asséptica ou linfocitária sem etiologia definida.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar P V, Camargo W, Vargas J, Guevara C, Roca Y, Felices V, Laguna-Torres V, Tesh R, Ksiazek T, Kochel T 2009. Reemergence of Bolivian hemorrhagic fever, 2007-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 1526–1528.
- Ajayi N a, Nwigwe CG, Azuogu BN, Onyire BN, Nwonwu EU, Ogbonnaya LU, Onwe FI, Ekaete T, Günther S, Ukwaja KN 2013. Containing a Lassa fever epidemic in a resource-limited setting: outbreak description and lessons learned from Abakaliki, Nigeria (January-March 2012). *Int. J. Infect. Dis.*: 1–6.
- Albariño CG, Bird BH, Chakrabarti AK, Dodd KA, Flint M, Bergeron E, White DM, Nichol ST 2011. The major determinant of attenuation in mice of the candid1 vaccine for argentine hemorrhagic Fever is located in the G2 glycoprotein transmembrane domain. *J. Virol.* 85: 10404–10408.
- Albariño CG, Posik DM, Ghiringhelli PD, Lozano ME, Romanowski V 1998. Arenavirus phylogeny: a new insight. *Virus Genes* 16: 39–46.
- Ambrosio AM, Enria DA, Maiztegui JI 1986. Junin virus isolation from lympho-mononuclear cells of patients with Argentine hemorrhagic fever. *Intervirology* 25: 97–102.
- Ambrosio AM, Riera LM, Saavedra MDC, Sabbatini MS 2006. Immune response to vaccination against Argentine hemorrhagic Fever in an area where different arenaviruses coexist *Intervirology* 25: 97–102.
- Ambrosio A, Saavedra M, Mariani M, Gamboa G, Maiza A 2011. Argentine hemorrhagic fever vaccines. *Hum. Vaccin.* 7: 694–700.
- Ambrosio M, Vallejos A, Saavedra C, Maiztegui JI 1990. Junin virus replication in peripheral blood mononuclear cells of patients with Argentine haemorrhagic fever. *Acta Virol.* 34: 58–63.
- Amman BR, Pavlin BI, Albariño CG, Comer JA, Erickson BR, Oliver JB, Sealy TK, Vincent MJ, Nichol ST, Paddock CD, Tumpey AJ, Wagoner KD, Glauer RD, Smith KA, Winpisinger KA, Parsely MS, Wyrick P, Hannafin CH, Bandy U, Zaki S, Rollin PE, Ksiazek TG 2007. Pet rodents and fatal lymphocytic choriomeningitis in transplant patients. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 719–725.

- Andrews BS, Theofilopoulos AN, Peters CJ, Loskutoff DJ, Brandt WE, Dixon FJ 1978. Replication of dengue and junin viruses in cultured rabbit and human endothelial cells. *Infect. Immun.* 20: 776–781.
- Archer AM, Rico-Hesse R 2002. High genetic divergence and recombination in Arenaviruses from the Americas. *Virology* 304: 274–281.
- Armstrong C, Lillie RD 1934. Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. *Public Health Rep.* 49: 1019–1027.
- Arribalzaga R 1955. Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido: hipertermia nefrotóxica, leucopénica y enantémica. *Dia Médico* 27: 1204–1210.
- Barrera Oro JG, McKee KT 1991. Toward a vaccine against Argentine hemorrhagic fever. *Bull. Pan Am. Health Organ.* 25: 118–126.
- Barry M, Russi M, Armstrong L, Geller D, Tesh R, Dembry L, Gonzalez JP, Khan AS, Peters CJ 1995. Brief report: treatment of a laboratory-acquired sabía virus infection. *N. Engl. J. Med.:* 294–296.
- Beyer WR, Pöppelau D, Garten W, Laer D von, Lenz O 2003. Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J. Virol.* 77: 2866–2872.
- Blasdell KR, Becker SD, Hurst J, Begon M, Bennett M 2008. Host range and genetic diversity of arenaviruses in rodents, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1455–1458.
- Bodewes R, Kik MJL, Raj VS, Schapendonk CME, Haagmans BL, Smits SL, Osterhaus a DME 2013. Detection of novel divergent arenaviruses in boid snakes with inclusion body disease in The Netherlands. *J. Gen. Virol.* 94: 1206–1210.
- Bonvicino CR, D’Andrea PS, Cerqueira R, Seuánez HN 1996. The chromosomes of *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae) with $2n = 52$, $2n = 56$, and interspecific hybrids ($2n = 54$). *Cytogenet. Cell Genet.* 73: 190–193.

- Bonvicino CR, Oliveira JA De, D'Andrea PS 2008. *Guia dos roedores do Brasil , com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos*. Centro Pan-Americano de Febre Adtosa - OPAS/OMS, Rio de Janeiro.
- Borrow P, Oldstone MB 1994. Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology* 198: 1–9.
- Bowen MD, Peters CJ, Mills JN, Nichol ST 1996a. Oliveros virus: a novel arenavirus from Argentina. *Virology* 217: 362–366.
- Bowen MD, Peters CJ, Nichol ST 1996b. The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology* 219: 285–290.
- Bowen MD, Rollin PE, Ksiazek TG, Hustad HL, Bausch DG, Demby AH, Bajani MD, Peters CJ, Nichol ST 2000. Genetic diversity among Lassa virus strains. *J. Virol.* 74: 6992–7004.
- Bracco MM de, Rimoldi MT, Cossio PM, Rabinovich A, Maiztegui JI, Carballal G, Arana RM 1978. Argentine hemorrhagic fever. Alterations of the complement system and anti-Junin-virus humoral response. *N. Engl. J. Med.* 299: 216–221.
- Brandling-Bennett D, Pinheiro F 1996. Infectious Diseases in Latin America and the Caribbean: Are They Really Emerging and Increasing? *Emerg. Infect. Dis.* 2: 59–61.
- de Bellocq JG, Borremans B, Katakweba A, Makundi R, Baird SJ, Becker-Ziaja B, Günther S, Leirs H 2010. Sympatric occurrence of 3 arenaviruses, Tanzania *Emerg Infect Dis.* 16: 692-695.
- Briese T, Paweska JT, McMullan LK, Hutchison SK, Street C, Palacios G, Khristova ML, Weyer J, Swanepoel R, Egholm M, Nichol ST, Lipkin WI 2009. Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa. *PLoS Pathog.* 5: e1000455.
- Briggiler A, Enría D, Feuillade MR 1987. Contagio interhumano e infeccion inaparente por virus Junin on matrimonios del area endemica de fiebre hemorragica argentina. *Medicina (B. Aires).* 47: 565–565.

- Briggiler A, Lewis S, Enria D 1990. Argentine hemorrhagic fever in pregnant women. *Medicina (B. Aires)*. 50: 443–444.
- Brummer-Korvenkontio M, Henttonen H, Vaheri A 1982. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Finland: ecology and virology of nephropathia epidemica. *Scand. J. Infect. Dis.* 36: 88–91.
- Buchmeier M, Adam E, Rawls WE 1974. Serological evidence of infection by Pichinde virus among laboratory workers. *Infect. Immun.* 9: 821–823.
- Buchmeier MJ, la Torre JC de, Peters CJ 2007. Arenaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM (Eds.), *Fields Virol.*, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia., pp. 1791–1828.
- Cajimat MNB, Milazzo ML, Bradley RD, Fulhorst CF 2012. Ocozocoautla de Espinosa Virus and Hemorrhagic Fever, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 18: 401–405.
- Cajimat MNB, Milazzo ML, Rollin PE, Nichol ST, Bowen MD, Ksiazek TG, Fulhorst CF 2009. Genetic diversity among Bolivian arenaviruses. *Virus Res.* 140: 24–31.
- Cao W, Henry MD, Borrow P, Yamada H, Elder JH, Ravkov E V, Nichol ST, Compans RW, Campbell KP, Oldstone MB 1998. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 282: 2079–2081.
- Cassens I, Tiedemann R, Hartl GB, Suchentrunk F 2000. Mitochondrial DNA variation in the European otter (*Lutra lutra*) and the use of spatial autocorrelation analysis in conservation. *J. Hered.* 91: 31–35.
- Castilla V, Mersich SE, Candurra NA, Damonte EB 1994. The entry of Junin virus into Vero cells. *Arch. Virol.* 136: 363–374.
- Charrel RN, Feldmann H, Fulhorst CF, Khelifa R, Chesse R de, Lamballerie X de 2002. Phylogeny of New World arenaviruses based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 1118–1124.

- Charrel RN, Lamballerie X de 2010. Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Vet. Microbiol.* 140: 213–220.
- Charrel RN, Lamballerie X de, Emonet S 2008. Phylogeny of the genus Arenavirus. *Curr. Opin. Microbiol.* 11: 362–368.
- Charrel RN, Lemasson JJ, Garbutt M, Khelifa R, Micco P De, Feldmann H, Lamballerie X de 2003. New insights into the evolutionary relationships between arenaviruses provided by comparative analysis of small and large segment sequences. *Virology* 317: 191–196.
- Coimbra TLM, Nassar ES, Burattini MN, Souza LT de, Ferreira I, Rocco IM, Rosa AP da, Vasconcelos PF, Pinheiro FP 1994. New arenavirus isolated in Brazil. *Lancet* 343: 391–392.
- Coimbra TLM, Santos RN, Ferreira IB, Fialho DM, Mello ES, Ferreira LMHL, Chamelet ELB 2001. Arenavirus: a fatal outcome. *Virus Rev. Res.* 1: 14–16.
- Cossio P, Laguens R, Arana R, Segal A, Maiztegui J 1975. Ultrastructural and immunohistochemical study of the human kidney in Argentine haemorrhagic fever. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 368: 1–9.
- Cummins D, McCormick JB, Bennett D, Samba JA, Farrar B, Machin SJ, Fisher-Hoch SP 1990. Acute sensorineural deafness in lassa fever. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 264: 2093–2096.
- Delgado S, Erickson BR, Agudo R, Blair PJ, Vallejo E, Albariño CG, Vargas J, Comer JA, Rollin PE, Ksiazek TG, Olson JG, Nichol ST 2008. Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia. *PLoS Pathog.* 4: e1000047.
- Demogines A, Abraham J, Choe H, Farzan M, Sawyer SL 2013. Dual host-virus arms races shape an essential housekeeping protein. *PLoS Biol.* 11: e1001571.
- Drake JW, Holland JJ 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 13910–13913.

- Eddy GA, Wagner FS, Scott SK, Mahlandt BJ 1975. Protection of monkeys against Machupo virus by the passive administration of Bolivian haemorrhagic fever immunoglobulin (human origin). *Bull. World Health Organ.* 52: 723–727.
- Edgar RC 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 113.
- Eichler R, Lenz O, Strecker T, Eickmann M, Klenk H-D, Garten W 2004. Lassa virus glycoprotein signal peptide displays a novel topology with an extended endoplasmic reticulum luminal region. *J. Biol. Chem.* 279: 12293–12299.
- Eichler R, Lenz O, Strecker T, Garten W 2003. Signal peptide of Lassa virus glycoprotein GP-C exhibits an unusual length. *FEBS Lett.* 538: 203–206.
- Ellis A, Mills JN, Childs JE, Muzzini MC, Mckee KT, Enria D a., Glass GE 1997. Structure and floristics of habitats associated with five rodent species in an agroecosystem in Central Argentina. *J. Zool.* 243: 437–460.
- Emonet SF, la Torre JC de, Domingo E, Sevilla N 2009. Arenavirus genetic diversity and its biological implications. *Infect. Genet. Evol.* 9: 417–429.
- Enria DA, Ambrosio AM, Briggiler AM, Feuillade MR, Crivell E 2010. Vacuna contra la fiebre hemorrágica argentina CANDID#1 producida en la argentina: inmunogenicidad y seguridad. *Medicina (B. Aires).* 70: 215–222.
- Enria DA, Briggiler AM, Fernandez NJ, Levis SC, Maiztegui JI 1984. Importance of dose of neutralising antibodies in treatment of Argentine haemorrhagic fever with immune plasma. *Lancet* 2: 255–256.
- Enria DA, Briggiler AM, Feuillade MR 1998. An overview of the epidemiological, ecological and preventive hallmarks of Argentine haemorrhagic fever (Junin virus). *Bull. Inst. Pasteur* 96: 103–114.
- Enria DA, Briggiler AM, Levis S, Vallejos D, Maiztegui JI, Canonico PG 1987. Tolerance and antiviral effect of ribavirin in patients with Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 7: 353–359.

- Enria D, Damilano AJ de, Briggiler AM 1985. Síndrome neurológico tardío en enfermos de fiebre hemorrágica Argentina tratados con plasma inmune. *Medicina (B. Aires)*. 45: 615–620.
- Enria D, García-Franco S, Ambrosio A, Vallejos D, Levis S, Maiztegui J 1986. Current status of the treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Med Microbiol Immunol* 175: 173–176.
- Enria DA, Maiztegui JI 1994. Antiviral treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 23: 23–31.
- Eschli B, Quirin K, Wepf A, Weber J, Zinkernagel R, Hengartner H 2006. Identification of an N-terminal trimeric coiled-coil core within arenavirus glycoprotein 2 permits assignment to class I viral fusion proteins. *J. Virol.* 80: 5897–5907.
- Ferreira MS 2003. Hantaviruses. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36: 81–96.
- Figueiredo LTM 2006. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39: 203–210.
- Fischer SA, Graham MB, Kuehnert MJ, Kotton CN, Srinivasan A, Marty FM, Comer JA, Guarner J, Paddock CD, DeMeo DL, Shieh W-J, Erickson BR, Bandy U, DeMaria A, Davis JP, Delmonico FL, Pavlin B, Likos A, Vincent MJ, Sealy TK, Goldsmith CS, Jernigan DB, Rollin PE, Packard MM, Patel M, Rowland C, Helfand RF, Nichol ST, Fishman JA, Ksiazek T, Zaki SR 2006. Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* 354: 2235–2249.
- Fraser D, Campbell C, Monath T, Goff P, Gregg M 1974. Lassa fever in the Eastern Province of Sierra Leone, 1970-1972. I. Epidemiologic studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23: 1131–1139.
- Fritz CL, Fulhorst CF, Enge B, Winthrop KL, Glaser CA, Vugia DJ 2002. Exposure to rodents and rodent-borne viruses among persons with elevated occupational risk. *J. Occup. Environ. Med.* 44: 962–967.
- Fulhorst CF, Bowen MD, Ksiazek TG, Rollin PE, Nichol ST, Kosoy MY, Peters CJ 1996. Isolation and characterization of Whitewater Arroyo virus, a novel North American arenavirus. *Virology* 224: 114–120.

- Fulhorst CE, Bowen MD, Salas RA, Manzione NM de, Duno G, Utrera A, Ksiazek TG, Peters CJ, Nichol ST, Miller E De, Tovar D, Ramos B, Vasquez C, Tesh RB 1997. Isolation and characterization of pirital virus, a newly discovered South American arenavirus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56: 548–553.
- Fulhorst CF, Cajimat MNB, Milazzo ML, Paredes H, Manzione NMC de, Salas RA, Rollin PE, Ksiazek TG 2008. Genetic diversity between and within the arenavirus species indigenous to western Venezuela. *Virology* 378: 205–213.
- Fulhorst CF, Charrel RN, Weaver SC, Ksiazek TG, Bradley RD, Milazzo ML, Tesh RB, Bowen MD 2001. Geographic distribution and genetic diversity of Whitewater Arroyo virus in the southwestern United States. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 403–407.
- Fulhorst CF, Ksiazek TG, Peters CJ, Tesh RB 1999. Experimental infection of the cane mouse *Zygodontomys brevicauda* (family Muridae) with guaranito virus (Arenaviridae), the etiologic agent of Venezuelan hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 180: 966–969.
- Fulhorst CF, Milazzo ML, Armstrong LR, Childs JE, Rollin PE, Khabbaz R, Peters CJ, Ksiazek TG 2007. Hantavirus and Arenavirus. Antibodies in Persons with Occupational Rodent Exposure North America. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 532–538.
- Gallaher WR, DiSimone C, Buchmeier MJ 2001. The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor. *BMC Microbiol.* 1: 1-100.
- Garcia J, Calderón G, Sabbatini MS 1996. Infeccion por virus Junin de Calomys musculinus en areas con diferente situacion epidemiologica para la fiebre hemorragica Argentina. *Medicina (B. Aires).* 56: 624–625.
- García Franco S, Ambrosio AM, Feuillade MR, Maiztegui JI 1988. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to Junin virus in human sera. *J Virol Methods* 19: 299–305.
- García JB, Morzunov SP, Levis S, Rowe J, Calderón G, Enría D, Sabbatini M, Buchmeier MJ, Bowen MD, St Jeor SC 2000. Genetic diversity of the Junin virus in Argentina: geographic and temporal patterns. *Virology* 272: 127–136.

- Gomez R, Giusti CJ, Sanchez MM, Vallduvi JF, Ferrer MF, Schattner M 2011. Junín virus. A XXI Century Update. *Microbes Infect.* 13: 303–311.
- Gomez RM, Pozner RG, Lazzari MA, D’Atri LP, Negrotto S, Chudzinski-Tavassi AM, Berría MI, Schattner M 2003. Endothelial cell function alteration after Junin virus infection. *Thromb. Haemost.* 90: 326–333.
- Gonzalez JP, Bowen MD, Nichol ST, Rico-Hesse R 1996. Genetic characterization and phylogeny of Sabiá virus, an emergent pathogen in Brazil. *Virology* 221: 318–324.
- González PH, Cossio PM, Arana R, Maiztegui JI, Laguens RP 1980. Lymphatic tissue in Argentine hemorrhagic fever. Pathologic features. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 104: 250–254.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27: 221–224.
- Grant A, Seregin A, Huang C, Kolokoltsova O, Brasier A, Peters C, Paessler S 2012. Junín Virus Pathogenesis and Virus Replication. *Viruses* 4: 2317–2339.
- Green DE, Mahlandt BG, McKee KT 1987. Experimental Argentine hemorrhagic fever in rhesus macaques: virus-specific variations in pathology. *J. Med. Virol.* 22: 113–133.
- Groseth A, Hoenen T, Weber M, Wolff S, Herwig A, Kaufmann A, Becker S 2011. Tacaribe virus but not junin virus infection induces cytokine release from primary human monocytes and macrophages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5: e1137.
- Günther S, Emmerich P, Laue T, Kühle O, Asper M, Jung A, Grewing T, Meulen J ter, Schmitz H 2000. Imported lassa fever in Germany: molecular characterization of a new lassa virus strain. *Emerg. Infect. Dis.* 6: 466–476.
- Harrison LH, Halsey NA, McKee KT, Peters CJ, Barrera Oro JG, Briggiler AM, Feuillade MR, Maiztegui JI 1999. Clinical case definitions for Argentine hemorrhagic fever. *Clin. Infect. Dis.* 28: 1091–1094.

- Heller M V, Marta RF, Sturk A, Maiztegui JI, Hack CE, Cate JW, Molinas FC 1995. Early markers of blood coagulation and fibrinolysis activation in Argentine hemorrhagic fever. *Thrombosis Haemost.* 73: 368–373.
- Heller M V, Saavedra MC, Falcoff R, Maiztegui JI, Molinas FC 1992. Increased Tumor Necrosis Factor- α Levels in Argentine Hemorrhagic Fever. *J. Infect. Dis.* 166: 1203–1204.
- Hetzl U, Sironen T, Laurinmäki P, Liljeroos L, Patjas A, Henttonen H, Vaheri A, Artelt A, Kipar A, Butcher SJ, Vapalahti O, Hepojoki J 2013. Isolation, identification, and characterization of novel arenaviruses, the etiological agents of bovid inclusion body disease. *J. Virol.* 87: 10918–10935.
- Holland JJ, La Torre JC De, Steinhauer DA 1992. RNA virus populations as quasispecies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176: 1–20.
- Howard C 1993. Antigenic Diversity among the Arenaviruses. In: Salvato M (Ed.), *The Arenaviridae*, Plenum Press, New York, USA., pp. 37–49.
- Ippolito G, Feldmann H, Lanini S, Vairo F, Caro A Di, Capobianchi M, Nicastrì E 2012. Viral hemorrhagic fevers: advancing the level of treatment. *BMC Med.* 10: 31.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128–144.
- J Casals 1975. Arenaviruses. *Yale J Biol Med* 48: 15–40.
- Jahrling PB, Marty FM, Geisbert TW 2004. VIRAL HEMORRHAGIC FEVERS. In: P B (Ed.), *Guidel. Clin. Manag. Haemorrh. fevers bioterrorism-related Haemorrh. fever viruses*, pp. 271–310.
- Johnson KM, Kuns ML, Mackenzie RB, Webb PA, Yunker CE 1966. Isolation of Machupo virus from wild rodent *Calomys callosus*. *Am J Trop Med Hyg* 15: 103–106.
- Johnson KM, Wiebnaga NH, Mackenzie RB, Kuns ML, Tauraso N, Shelokov A, Webb PA, Justines G, Beye HK 1965. Virus isolation from human cases of hemorrhagic fever in Bolivia. *Proc Soc Exp Biol Med* 118: 113–118.

- Justines G, Johnson KM 1969. Immune tolerance in *Calomys callosus* infected with Machupo virus. *Nature* 222: 1090–1091.
- Kastello MD, Eddy GA, Kuehne RW 1976. A Rhesus Monkey Model for the Study of Bolivian Hemorrhagic Fever. *J. Infect. Dis.* 133: 57–62.
- Kelt DA, Hafner MS 2010. Updated guidelines for protection of mammalogists and wildlife researchers from hantavirus pulmonary syndrome (HPS). *J. Mammal.* 91: 1524–1527.
- Kilgore PE, Peters CJ, Mills JN, Rollin PE, Armstrong L, Khan AS, Ksiazek TG 1995. Prospects for the Control of Bolivian Hemorrhagic Fever. *Medicina (B. Aires)*. 1: 1–10.
- Kuns ML 1965. Epidemiology of Machupo virus infection. II. Ecological and control studies of hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 14: 813–816.
- Kunz S, Edelmann KH, la Torre J-C de, Gorney R, Oldstone MBA 2003. Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions. *Virology* 314: 168–178.
- Lang J, Wood SC 1999. Development of orphan vaccines: an industry perspective. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 749–756.
- Levis S, Feuillade MR, Enria DA, Ambrosio AM, Briggiler AM, McKee JI, Maiztegui J 1993. Persistencia de la inmunidad humoral específica en receptores de la vacuna Candid # 1 contra la Fiebre Hemorrágica Argentina. *Medicina (B. Aires)*. 53: 131–135.
- Levis SC, Saavedra MC, Ceccoli C, Feuillade MR, Enria DA, Maiztegui JI, Falcoff R 1985. Correlation between endogenous interferon and the clinical evolution of patients with Argentine hemorrhagic fever. *J. Interferon Res.* 5: 383–389.
- López N, Franze-Fernández MT 2007. A single stem-loop structure in Tacaribe arenavirus intergenic region is essential for transcription termination but is not required for a correct initiation of transcription and replication. *Virus Res.* 124: 237–244.
- López N, Scolaro L, Rossi C, Jácamo R, Candurra N, Pujol C, Damonte EB, Franze-Fernández MT 2000. Homologous and heterologous glycoproteins induce protection against Junin virus challenge in guinea pigs. *J. Gen. Virol.* 81: 1273–1281.

- Lozano ME, Enría D, Maiztegui JI, Grau O, Romanowski V 1995. Rapid diagnosis of Argentine hemorrhagic fever by reverse transcriptase PCR-based assay. *J Med Virol.* 27: 80–85.
- Lozano ME, Ghiringhelli PD, Romanowski V, Grau O 1993. A simple nucleic acid amplification assay for the rapid detection of Junín virus in whole blood samples. *Virus Res.* 27: 37–53.
- Lukashevich IS 1992. Generation of reassortants between African arenaviruses. *Virology* 188: 600–605.
- Machado AM, Figueiredo GG, Campos GM, Lozano ME, Machado AM, Figueiredo LTM 2010. Standardization of an ELISA test using a recombinant nucleoprotein from the Junin virus as the antigen and serological screening for arenavirus among the population of Nova Xavantina, State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Tro* 43: 229–233.
- Macher AM, Wolfe MS 2006. Historical Lassa Fever Reports and 30-year Clinical Update. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 835–837.
- Mackenzie RB, Beye HK, Valverde L, Garron H 1964a. Epidemic hemorrhagic fever in Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13: 620–625.
- Mackenzie RB, Beye HK, Valverde L, Garrón H 1964b. Epidemic hemorrhagic fever in Bolivia. I. A preliminary report of the epidemiologic and clinical findings in a new epidemic area in South America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13: 620–625.
- Maiztegui JI 1975. Clinical and epidemiological patterns of argentine hemorrhagic fever. *Bull World Heal. Organ* 52: 567–575.
- Maiztegui JI, Fernandez NJ, Damilano AJ de 1979. *Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine haemorrhagic fever and association between treatment and a late neurological syndrome.*
- Maiztegui JI, Feuillade MR, Briggiler AM 1986. Progressive extension of the endemic area and changing incidence of Argentine hemorrhagic fever. *Med Microbiol Immunol* 175.

- Maiztegui JI, McKee KT, Barrera Oro JG, Harrison LH, Gibbs PH, Feuillade MR, Enria DA, Briggiler AM, Levis SC, Ambrosio AM, Halsey NA, Peters CJ 1998. Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. *AHF Study Group*.
- Maiztegui JI, Sabattini MS 1977. Extension progresiva del area endemica de Fiebre hemorragica. *Medicina (B. Aires)*. 37: 162–166.
- Manzione N de, Salas RA, Paredes H, Godoy O, Rojas L, Araoz F, Fulhorst CF, Ksiazek TG, Mills JN, Ellis BA, Peters CJ, Tesh RB 1998. Venezuelan hemorrhagic fever: clinical and epidemiological studies of 165 cases. *Clin. Infect. Dis.* 26: 308–313.
- Manzione N, Salas RA, Paredes H, Enria D, Briggiler AM 1995. *Manual para la Vigilancia Epidemiológica Ministerio del Poder popular para la salud y protección Social*.
- Marta RF, Montero VS, Hack CE, Sturk A, Maiztegui JI, Molinas FC 1999. Proinflammatory cytokines and elastase-alpha-1-antitrypsin in Argentine hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 85–89.
- Martinez MG, Cordo SM, Candurra NA 2007. Characterization of Junin arenavirus cell entry. *J. Gen. Virol.* 88: 1776–1784.
- McKee KT, Barrera Oro JG, Kuehne AI, Spisso J, Mahlandt BG 1993. Safety and immunogenicity of a live attenuated Junin (Argentine hemorrhagic fever) vaccine in Rhesus macaques. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48: 403–411.
- McKee KT, Mahlandt BG, Maiztegui JI, Green DE, Peters CJ 1987. Virus-specific factors in experimental Argentine hemorrhagic fever in rhesus macaques. *J. Med. Virol.* 22: 99–111.
- Mclay L, Ansari A, Liang Y, Ly H 2013. Targeting virulence mechanisms for the prevention and therapy of arenaviral hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 97: 81–92.
- Mercado RR 1975. Rodent control programmes in areas affected by Bolivian haemorrhagic fever. *Bull World Heal. Organ* 52: 1–10.
- Meyer BJ, la Torre JC de, Southern PJ 2002. Arenaviruses: genomic RNAs, transcription, and replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 262: 139–157.

- Meyer BJ, Southern PJ 1994. Sequence heterogeneity in the termini of lymphocytic choriomeningitis virus genomic and antigenomic RNAs. *J. Virol.* 68: 7659–7664.
- Milazzo ML, Cajimat MNB, Duno G, Duno F, Utrera A, Fulhorst CF 2011. Transmission of Guanarito and Pirital Viruses among Wild Rodents, Venezuela. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 2209–2215.
- Mills JN, Alva H, Ellis BA, Wagoner KD, Childs JE, Calderón G, Enría DA, Jahrling PB 2007. Dynamics of oliveros virus infection in rodents in central Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7: 315–323.
- Mills JN, Barrera Oro JG, Bressler DS, Childs JE, Tesh RB, Smith JF, Enria DA, Geisbert TW, McKee KT, Bowen MD, Peters CJ, Jahrling PB 1996. Characterization of Oliveros virus, a new member of the Tacaribe complex (Arenaviridae: Arenavirus). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54: 399–404.
- Mills JN, Childs JE 1998. Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 529–537.
- Mills JN, Ellis BA, Childs JE, McKee KT, Maiztegui JI, Peters CJ, Ksiazek TG, Jahrling PB 1994. Prevalence of infection with Junin virus in rodent populations in the epidemic area of Argentine hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 554–562.
- Mills JN, Ellis BA, McKee KT, Calderon GE, Maiztegui JI, Nelson GO, Ksiazek TG, Peters CJ, Childs JE 1992. A longitudinal study of Junin virus activity in the rodent reservoir of Argentine hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47: 749–763.
- Mills JN, Ellis BA, McKee KT, Ksiazek TG, Oro JG, Maiztegui JI, Calderon GE, Peters CJ, Childs JE 1991. Junin virus activity in rodents from endemic and nonendemic loci in central Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44: 589–597.
- Molinas FC, Bracco MM, Maiztegui JI 1989. Hemostasis and the Complement System in Argentine Hemorrhagic Fever. *Rev. Infect. Dis.* 11.
- Monath T, Mertens P, Patton R, Moser C, Baum J, Pinneo L, Gary C, Kissling R 1973. A hospital epidemic of Lassa fever in Zorzor, Liberia, March-April 1972. *Am J Trop Med Hyg* 22: 773–779.

- Nowak RM 1991. *Walker's mammals of the world*. Johns Hopkins University Press., Baltimore.
- Oliveira J, Bonvicino C 2006. Ordem Rodentia. In: Reis N, Peracchi A, Pedro W, Lima I (Eds.), *Mamíferos do Bras.*, Suprema, Londrina, Paraná, pp. 347–400.
- Palacios G, Druce J, Du L, Tran T, Birch C, Briese T, Conlan S, Quan P-L, Hui J, Marshall J, Simons JF, Egholm M, Paddock CD, Shieh W-J, Goldsmith CS, Zaki SR, Catton M, Lipkin WI 2008. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *N. Engl. J. Med.* 358: 991–998.
- Parodi AS, Greenway DJ, Rugiero HR, Rivero S, Frigerio M, la Barrera JM de, Mettier N, Garzon F, Boxaca M, Guerrero L de, Nota N 1958. Sobre la etiologia del brote epidemico. *Dia Médico* 30: 2300–2301.
- Pedrosa PBS, Cardoso TAO 2011. Viral infections in workers in hospital and research laboratory settings: a comparative review of infection modes and respective biosafety aspects. *Int. J. Infect. Dis.* 15: e366–e376.
- Perez M, la Torre JC de 2003. Characterization of the genomic promoter of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 77: 1184–1194.
- Peters CJ 2006. Emerging Infections: Lessons from the viral hemorrhagic fevers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 117: 1–10.
- Peters CJ, Jahrling PB, Liu CT 1987. Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 134: 55–68.
- Peters C, Kuehne R, Mercado R, Bow R Le, Spertzel R, Webb P 1974. Hemorrhagic fever in Cochabamba, Bolivia, 1971. *Am J Epidemiol.* 99: 425–433.
- Peters CJ, Kufhne RW, Mercado RR, Bow RH Le, Spertzei RO, Webb PA 1971. HEMORRHAGIC FEVER IN COCHABAMBA, BOLIVIA. *Am. J. Epidemiol.*: 1–10.
- Peters CJ, Webb PA, Johnson KM 1973. Measurement of antibodies to Machupo virus by the indirect fluorescent technique. *Proc Soc Exp Biol Med* 142: 526–531.

- Pinheiro F, Shope RE, Andrade AP, Ba G 1966. Amapari, a New Virus of the Tacaribe Group from Rodents and Mites of Amapa Territory, Brazil. *Exp. Biol. Med.* 122: 531–535.
- Pinheiro F, Webber JP, Rosa Travassos APA Da 1977. Studies of arenaviruses in Brazil. *Medicina (B. Aires)*. 37: 175–181.
- Pinschewer DD, Perez M, la Torre JC de 2003a. Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication. *J. Virol.* 77: 3882–3887.
- Pinschewer DD, Perez M, Sanchez AB, la Torre JC de 2003b. Recombinant lymphocytic choriomeningitis virus expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 7895–7900.
- Pirosky I, Zuccarini J, Molinelli EA, Pietro A Di, Barrera Oro JG, Martini P, Copello AR 1959. Virosis Hemomigica del Noroeste Bonaerense, Ministerio de Asistencia Social y Salud Publica, Buenos Aires. *Dia Médico* 1: 1–10.
- Ponzinibbio C, González PH, Maiztegui J, Laguens RP 1979. [Morphological study of human bone marrow in Argentinian hemorrhagic fever]. *Medicina (B. Aires)*. 39: 441–446.
- Qi X, Lan S, Wang W, Schelde LM, Dong H, Wallat GD, Ly H, Liang Y, Dong C 2010. Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature* 468: 779–783.
- Radoshitzky SR, Abraham J, Spiropoulou CF, Kuhn JH, Nguyen D, Li W, Nagel J, Schmidt PJ, Nunberg JH, Andrews NC, Farzan M, Choe H 2007. Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* 446: 92–96.
- Radoshitzky SR, Kuhn JH, Kok-Mercado F de, Jahrling PB, Bavari S 2012. Drug discovery technologies and strategies for Machupo virus and other New World arenaviruses. *Expert Opin. Drug Discov.* 7: 613–632.
- Riera LM, Feuillade MR, Saavedra MC, Ambrosio AM 1997. Evaluation of an enzyme immunosorbent assay for the diagnosis of Argentine haemorrhagic fever. *Acta Virol.* 41: 305–310.

- Rivers TM, Scott TFM 1936. Meningitis in man caused by a filterable virus. II. Identification of the etiological agent. *J Exp Med* 63: 415–432.
- Rodas JD, Salvato MS 2006. Tales of mice and men: Natural History of Arenaviruses. *Rev Col Cienc Pec* 19: 1–10.
- Rojek JM, Sanchez AB, Nguyen NT, la Torre J-C de, Kunz S 2008. Different mechanisms of cell entry by human-pathogenic Old World and New World arenaviruses. *J. Virol.* 82: 7677–7687.
- Rowe WP, Murphy FA, Bergold GH, Casals J, Hotchin J, Johnson KM, Lehmann-Grube F, Mins CA, Traub E, Webb PA 1970. Arenoviruses: Proposed Name for a Newly Defined Virus Group. *J. Virol.* 5: 651–652.
- Ruo SL, Mitchell SW, Kiley MP, Roumillat LF, Fisher-Hoch SP, McCormick JB 1991. Antigenic relatedness between arenaviruses defined at the epitope level by monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 3): 549–555.
- Sabattini MS, Gonzalez de Rios LE, Dial G, Vega VR 1997. Infeccion natural y experimental de roedores con virus Junin. *Medicina (B. Aires).* 37: 149–159.
- Salas R, Manzione N de, Tesh RB, Rico-Hesse R, Shope RE, Betancourt A, Godoy O, Bruzual R, Pacheco ME, Ramos B 1991. Venezuelan haemorrhagic fever. *Lancet* 338: 1033–1036.
- Salazar-Bravo J, Dragoo JW, Bowen MD, Peters CJ, Ksiazek TG, Yates TL 2002. Natural nidality in Bolivian hemorrhagic fever and the systematics of the reservoir species. *Infect. Genet. Evol.* 1: 191–199.
- Salvato MS, Clegg JCS, Buchmeier MJ, Charrel RN, Gonzalez JP, Lukashevich IS, Peters CJ, Rico-Hesse R, Romanowski V 2005a. Classification and Nomenclature of Viruses. *8th ICTV Rep. Int. Comm. Taxon. Viruses.*
- Salvato MS, Clegg JCS, Buchmeier MJ, Charrel RN, Gonzalez JP, Lukashevich IS, Peters CJ, Rico-Hesse R, Romanowski V 2005b. Family Arenaviridae. In: : Van Regenmortel MH V, Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Eds.), *Taxon. Eighth Rep. Int. Comm. Taxon. Viruses.*, Academic Press.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Laboratory Press.
- Sanchez A, Pifat DY, Kenyon RH, Peters CJ, McCormick JB, Kiley MP 1989. Junin virus monoclonal antibodies: characterization and cross-reactivity with other arenaviruses. *J. Gen. Virol.* 70 (Pt 5): 1125–1132.
- Sevilla N, la Torre JC de 2006. Arenavirus diversity and evolution: quasispecies in vivo. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 299: 315–335.
- Shimajima M, Kawaoka Y 2012. Cell Surface Molecules Involved in Infection Mediated by Lymphocytic Choriomeningitis Virus Glycoprotein. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 1363–1366.
- Shtanko O, Imai M, Goto H, Lukashevich IS, Neumann G, Watanabe T, Kawaoka Y 2010. A role for the C terminus of Mopeia virus nucleoprotein in its incorporation into Z protein-induced virus-like particles. *J. Virol.* 84: 5415–5422.
- Simone C Di, Buchmeier MJ 1995. Kinetics and pH dependence of acid-induced structural changes in the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein complex. *Virology* 209: 3–9.
- Simone C Di, Zandonatti MA, Buchmeier MJ 1994. Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike. *Virology* 198: 455–465.
- Smith MF, Patton JL 1991. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Mol. Biol. Evol.* 8: 85–103.
- Spiropoulou CF, Kunz S, Rollin PE, Campbell KP, Oldstone MBA 2002. New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor. *J. Virol.* 76: 5140–5146.
- Stenglein MD, Sanders C, Kistler AL, Ruby JG, Franco JY, Reavill DR, Dunker F, DeRisi JL 2012. Identification, Characterization, and In Vitro Culture of Highly Divergent Arenaviruses from Boa Constrictors and Annulated Tree Boas: Candidate Etiological Agents for Snake Inclusion Body Disease. *MBio* 3: e00180–12–e00180–12.

- Stephensen CB, Blount SR, Lanford RE, Holmes K V, Montali RJ, Fleenor ME, Shaw JF 1992. Prevalence of serum antibodies against lymphocytic choriomeningitis virus in selected populations from two U.S. cities. *J Med Virol* 38: 27–31.
- Strecker T, Eichler R, Meulen J ter, Weissenhorn W, Dieter Klenk H, Garten W, Lenz O 2003. Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *J. Virol.* 77: 10700–10705.
- 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. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.
- Terrell TG, Stookey JL, Spertzei RO, Kuehne RW 1973. Comparative histopathology of two strains of Bolivian hemorrhagic fever virus infections in suckling hamsters. *Am J Trop Med Hyg* 22: 814–818.
- Tesh RB 2002. Viral hemorrhagic fevers of South America. *Biomedica* 22: 287–295.
- Tesh RB, Jahrling PB, Salas R, Shope RE 1994. Description of Guanarito virus (Arenaviridae: Arenavirus), the etiologic agent of Venezuelan hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50: 452–459.
- Tesh RB, Wilson ML, Salas R, Manzione NM De, Tovar D, Ksiazek TG, Peters CJ 1993. Field studies on the epidemiology of Venezuelan hemorrhagic fever: implication of the cotton rat *Sigmodon alstoni* as the probable rodent reservoir. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49: 227–235.
- Timothy J, Doyle M, Ralph TB, Peters CJ 1998. EMERGING INFECTIOUS DISEASES VIRAL HEMORRHAGIC FEVERS AND HANTAVIRUS INFECTIONS IN THE AMERICAS. In: Doyle TJ, T BR, Clarence P (Eds.), *Infect. Dis. Clin. North Am.*, pp. 95–110.
- Torres-Perez F, Wilson L, Collinge SK, Harmon H, Ray C, Medina RA, Hjelle B 2010. Sin Nombre virus infection in field workers, Colorado, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 308–310.

- Tortorici MA, Albariño CG, Posik DM, Ghiringhelli PD, Lozano ME, Rivera Pomar R, Romanowski V 2001. Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity in vivo. *Virus Res.* 73: 41–55.
- Traub E 1936. An epidemic in a mouse colony due to the virus of acute lymphocytic choriomeningitis. *J Exp Med* 63: 533–546.
- Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Yokosawa H, Yasuda J 2006. Cellular factors required for Lassa virus budding. *J. Virol.* 80: 4191–4195.
- Urata S, Yasuda J 2012. Molecular Mechanism of Arenavirus Assembly and Budding. *Viruses* 4: 2049–2079.
- Utrera A, Duno G 2007. Preferencias de hábitat de *Sigmodon alstoni* y *Zygodontomys brevicauda* (Rodentia , Cricetidae) en agroecosistemas de los llanos de Venezuela. *Interciencia* 32: 471–476.
- Utrera A, Duno G, Ellis BA, Salas RA, Manzione NM de, Fulhorst CF, Tesh RB, Mills JN 2000. Small mammals in agricultural areas of the western llanos of Venezuela: community structure, habitat associations, and relative densities. *J. Mammal.* 81: 536–548.
- Vainrub B, Salas R 1994a. Latin American hemorrhagic fever. *Infect Dis Clin North Am.* 8: 47–59.
- Vainrub B, Salas RA 1994b. Latin American Hemorrhagic Fever. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 8: 47–59.
- Vargas HP 2013. BOTICA, Revista Digital Venezolana con Informacion para el Medico. *Fiebre Hemorragica Venez. Fiebre Guanarito.*
- Vasconcelos PFC, Andrade AP, Travassos Da Rosa APA, Rodrigues SG, Tesh R, Travassos da Rosa JFS, Travassos Da Rosa ES 1993. Infecção humana adquirida em laboratório causada pelo virus SP H114202 (Arenavírus: Família Arenaviridae): Aspectos Clínicos e Laboratoriais. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 35: 521–525.
- Villagra M, Suarez L, Arce R, Moreira MG 1994. Bolivian hemorrhagic fever—El Beni Department, Bolivia, 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 43.

- Vitullo AD, Hodara VL, Merani MS 1987. Effect of persistent infection with Junin virus on growth and reproduction of its natural reservoir, *Calomys musculus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 663–669.
- Vitullo AD, Merani MS 1988. Is vertical transmission sufficient to maintain Junin virus in nature? *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 6): 1437–1440.
- Vitullo AD, Merani MS 1990. Vertical transmission of Junin virus in experimentally infected adult *Calomys musculus*. *Intervirology* 31: 339–344.
- Voss R 1991. An introduction to the Neotropical Muroid rodent Genus *Zygodontomys*. *Bull AM Mus Nat Hist.*
- Weaver SC, Salas RA, Manzione N de, Fulhorst CF, Duno G, Utrera A, Mills JN, Ksiazek TG, Tovar D, Tesh RB 2000. Guanarito virus (Arenaviridae) isolates from endemic and outlying localities in Venezuela: sequence comparisons among and within strains isolated from Venezuelan hemorrhagic fever patients and rodents. *Virology* 266: 189–195.
- Webb PA, Johnson KM, Mackenzie RB 1969. The measurement of specific antibodies in bolivian hemorrhagic fever by neutralization of virus plaques. *P. Soc. Exp. Biol.* 130: 1013–1019.
- Webb PA, Johnson KM, Mackenzie RB, Kuns ML 1967. Some characteristics of Machupo virus, causative agent of Bolivian hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 16.
- Webb PA, Justines G, Johnson KM 1975. Infection of wild and laboratory animals with Machupo and Latino viruses. *Bull. World Health Organ.* 52: 493–499.
- Weissenbacher MC, Laquens RP, Coto CE 1987. Argentine hemorrhagic fever. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 134: 76–116.
- Wiebenga NH 1965. Immunologic studies of Tacaribe, Junín and Machupo viruses. *Am J Trop Med Hyg* 14: 802–808.
- Wolff S, Ebihara H, Groseth A 2013. Arenavirus Budding: A Common Pathway with Mechanistic Differences. *Viruses*: 528–549.

- York J, Nunberg JH 2006. Role of the stable signal peptide of Junín arenavirus envelope glycoprotein in pH-dependent membrane fusion. *J. Virol.* 80: 7775–7780.
- Zapata JC, Salvato MS 2013. Arenavirus Variations Due to Host-Specific Adaptation. *Viruses*: 241–278.

10.1. QUADRO SUPLEMENTAR 1.1

Quadro 1.1. Distribuição geográfica, doença associada e principais reservatórios dos arenavírus identificados no Velho e no Novo Mundo

<i>Arenavirus</i>	Linhagem	Reservatório	Distribuição geográfica	Doença associada
Academy of sciences (ACSV)	Ainda não descrita	<i>Corallus annulatus</i> - (Serpente)	EUA-Califórnia	Corpúsculo de inclusão em serpentes
Allpahuayo (ALLV)*	Novo Mundo Clade A	<i>Oecomys bicolor</i> <i>Oecomys paricola</i>	Peru-Loreto	<i>Desconhecido</i>
Amapari (AMPV)*	Novo Mundo Clade B	<i>Neacomys guianae</i> <i>Oryzomys capito</i>	Brasil-Amapá	<i>Desconhecido</i>
Bear Canyon (BCNV)*	Novo Mundo Clade A-rec	<i>Peromyscus californicus</i> <i>Neotoma macrotis</i>	EUA-Califórnia	<i>Desconhecido</i>
Big Brushy Tank (BBTV)	Novo Mundo Clade A-rec	<i>Neotoma albigola</i>	EUA-Arizona	<i>Desconhecido</i>
Black Mesa	Novo Mundo Clade A-rec	<i>Neotma albigola</i>	EUA-Oklahoma	<i>Desconhecido</i>
Catarina (CTNV)	Novo Mundo Clade A-rec	<i>Neotoma micropus</i>	EUA-Texas	<i>Desconhecido</i>
Chapare (CHPV)*	Novo Mundo Clade B	<i>Desconhecido</i>	Bolívia-Cochabamba	Pequeno surto de Febre hemorrágica
Coriominigite linfocítica (LCMV)*	Velho Mundo	<i>Mus musculus</i>	Mundial	Doença febril; meningite asséptica
Cupixi (CPXV)*	Novo Mundo Clade B	<i>Oryzomys capito</i>	Brasil-Amapá	<i>Desconhecido</i>
Dandenong	Velho Mundo	<i>Desconhecido</i>	Austrália	Quadro de Encefalite em paciente imunossuprimido após transplante
Flexal (FLEV)*	Novo Mundo Clade A	<i>Oryzomys spp</i>	Brasil-Pará	Doença febril, adquirida em laboratório
Gbagroube	Velho Mundo	<i>Mus (Nannomys) setulosus</i>	Costa do Marfim	<i>Desconhecido</i>
Golden Gate (GGV)	Ainda não descrita	<i>Boa constrictor</i> – (Serpente)	EUA-Califórnia	Corpúsculo de inclusão em serpentes
Guanarito (GTOV)*	Novo Mundo Clade B	<i>Zigodontomys brevicauda</i>	Venezuela central	Febre hemorrágica Venezuelana

Quadro 1.1. cont. Distribuição geográfica, doença associada e principais reservatórios dos arenavírus identificados no Velho e no Novo Mundo

<i>Arenavirus</i>	Linhagem	Reservatório	Distribuição geográfica	Doença associada
Ippy (IPPV)*	Velho Mundo	<i>Arvicanthis</i> sp.	África central	<i>Desconhecido</i>
Junín (JUNV)*	Novo Mundo Clade B	<i>Calomys musculinus</i>	Argentina central	Febre hemorrágica Argentina
Kodoko	Velho Mundo	<i>Nannomys minutoides</i> , <i>Mus</i> (<i>Nannomys</i>)	Guiné	<i>Desconhecido</i>
Lassa (LASV)*	Velho Mundo	<i>Mastomys</i> sp.	Oeste da África	Febre do Lassa
Latino (LATV)*	Novo Mundo Clade C	<i>Calomys callosus</i>	Bolívia-Santa Cruz	<i>Desconhecido</i>
Lujo (LUJV)*	Velho Mundo	<i>Desconhecido</i>	Sudeste da África	Surto de febre hemorrágica de transmissão nosocomial
Luna (LUNV)*	Velho Mundo	<i>Mastomys natalensis</i>	Sudeste da África	<i>Desconhecido</i>
Machupo (MACV)*	Novo Mundo Clade B	<i>Calomys callosus</i>	Bolívia-Beni	Febre hemorrágica Boliviana
Menekre	Velho Mundo	<i>Hylomyscus</i> sp.	Costa do Marfim	<i>Desconhecido</i>
Middle Pease River (MPRV)	Novo Mundo Clade A-rec	<i>Neotoma micropus</i>	EUA-Texas	<i>Desconhecido</i>
Mobala (MOBV)*	Velho Mundo	<i>Praomys</i> sp.	África Central	<i>Desconhecido</i>
Mopeia (MOPV)*	Velho Mundo	<i>Mastomys natalensis</i>	Sudeste da África	<i>Desconhecido</i>
Morogoro	Velho Mundo	<i>Mastomys natalensis</i>	Tanzânia	<i>Desconhecido</i>
Ocozocoautla de Espinosa (OCEV)	Novo Mundo Clade	<i>Peromyscus mexicanus</i>	México-Chiapas	Possível agente causador de febre hemorrágica na década de 1960
Oliveros (OLVV)*	Novo Mundo Clade C	<i>Necromys benefactus</i>	Central da Argentina	<i>Desconhecido</i>
Paraná (PARV)*	Novo Mundo Clade A	<i>Oryzomys buccinatus</i>	Sul do Paraguai	<i>Desconhecido</i>
Pichinde (PICV)*	Novo Mundo Clade A	<i>Oryzomys albigularis</i>	Sul da Colômbia	Soroconversão sem doença associada

Quadro 1.1. cont. Distribuição geográfica, doença associada e principais reservatórios dos arenavírus identificados no Velho e no Novo Mundo

<i>Arenavirus</i>	Linhagem	Reservatório	Distribuição geográfica	Doença associada
Pinhal	Novo Mundo Clade C	<i>Calomys tener</i>	Brasil-São Paulo	Possível caso de febre hemorrágica
Pirital (PIRV)*	Novo Mundo Clade A	<i>Sigmodon alstoni</i>	Venezuela Central	<i>Desconhecido</i>
Sabiá (SABV)*	Novo Mundo Clade B	<i>Desconhecido</i>	Brasil-São Paulo	Febre hemorrágica Brasileira e dois casos de infecção laboratorial subsequentes
Skinner Tank (SKTV)	Novo Mundo Clade A-rec	<i>Neotoma mexicana</i>	EUA-Arizona	<i>Desconhecido</i>
Tacaribe (TACV)*	Novo Mundo Clade A-rec	<i>Artibeus sp.</i> – (morcego)	Trinidad	Doença febril, adquirida em laboratório
Tamiami (TAMV)*	Novo Mundo Clade A-rec	<i>Sigmodon hispidus</i>	EUA-Florida	<i>Desconhecido</i>
Tonto Creek (TTCV)	Novo Mundo Clade A-rec	<i>Neotoma albigula</i>	EUA-Arizona	<i>Desconhecido</i>
University of Helsinki (UHV)	Ainda não descrita	<i>Boa constrictor</i> – (Serpente)	Finlândia	Corpúsculo de inclusão em serpentes
Withewater Arroyo (WWAV)*	Novo Mundo Clade A-rec	<i>Neotoma spp.</i>	Sudeste dos EUA	Possível caso de febre hemorrágica

* Arenavírus reconhecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia viral (CITV).

10.2. QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PROFISSIONAIS DE SAÚDE QUE MANUSEIAM ANIMAIS

RISCO BIOLÓGICO EM PROFISSIONAIS COM ATIVIDADES ASSOCIADAS COM ANIMAIS SILVESTRES

Nome completo:	
Instituição de origem:	
Laboratório:	Pavilhão:
Departamento:	Sala:
Responsável:	Telefone:
1. Formação:	Ano:
2. Informe quando iniciou as atividades associadas com animais e as linhas de pesquisa/estudo desenvolvidas e a atual	
3. Marque as Atividades Associadas com Captura e Processamento de Animais Desenvolvidas e Informe o Período.	
<input type="checkbox"/> captura de animais silvestres Período: Quais: Especificar áreas:	
<input type="checkbox"/> manuseio de animais domésticos Período: Quais: Especificar áreas:	
<input type="checkbox"/> coleta de invertebrados vetores, com ênfase em artrópodes Período: Quais: Especificar áreas:	
<input type="checkbox"/> necropsia de animais silvestres Período: Quais:	
<input type="checkbox"/> necropsia de animais domésticos Período: Quais:	
<input type="checkbox"/> bioterismo Período: Quais:	
<input type="checkbox"/> outras. Especificar: Período: Quais:	
4. Caso realize atividades de campo, informar as áreas de estudo [informar data]	
5. Sobre o uso de equipamentos de proteção individual (EPI), por favor, informe.	
<input type="checkbox"/> Não utilizo qualquer EPI <input type="checkbox"/> Todas suas atividades são realizadas com EPIs Quais são sempre utilizados? Quais são eventualmente utilizados? Quais não são utilizados, mas que considera importante utilizar?	
6. Em caso de ter apresentado, durante o período no qual vem realizando atividades com animais, algum quadro clínico infeccioso que você considere importante [circule o item], favor informar data provável.	

- 6.1 febre _____/_____/_____
- 6.2 náusea/vômitos _____/_____/_____
- 6.3. cefaléia _____/_____/_____
- 6.4.hipotensão _____/_____/_____
- 6.5.dor torácica _____/_____/_____
- 6.6. manifestações neurológicas _____/_____/_____
- 6.7. tosse _____/_____/_____
- 6.8. mialgia _____/_____/_____
- 6.9. choque _____/_____/_____
- 6.10.tontura/vertigem _____/_____/_____
- 6.11. insuficiência respiratória _____/_____/_____
- 6.12.dor lombar _____/_____/_____
- 6.13. exantema _____/_____/_____
- 6.14.insuficiência respiratória _____/_____/_____
- 6.15.diarréia _____/_____/_____
- 6.16.insuficiência renal _____/_____/_____
- 6.17. dor abdominal _____/_____/_____
- 6.18.icterícia _____/_____/_____
- 6.19.hepato / esplenomegalia _____/_____/_____
- 6.20.convulsão _____/_____/_____
- 6.21.prostação _____/_____/_____
- 6.22.linfadenopatia _____/_____/_____
- 6.23. Outras manifestações: _____

7. Informe situação vacinal – está vacinado(a):

Hepatite A () Sim. () Não	Data de vacinação:
Hepatite B () Sim. () Não	Data de vacinação:
Tétano/Difteria () Sim. () Não	Data de vacinação:
Raiva () Sim. () Não	Data de vacinação:
Febre Amarela () Sim. () Não	Data de vacinação:
Meningococo () Sim. () Não	Data de vacinação:
Outra: _____	Data de vacinação:

8. OBSERVAÇÃO:

9. Autoriza a COLETA DE SANGUE para realização de exames para pesquisa de anticorpos de classe IgG e/ou IgM (hantavirose, febre maculosa, hepatites A e B, leptospirose, febre amarela), além de exame coprológico com o objetivo de avaliar profissionais que manipulam animais e realizam trabalho de campo?

() Sim () Não

assinatura

10.3. TCLE

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O sr. /sra. _____ está convidado a participar do "ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE SAÚDE DOS PROFISSIONAIS QUE MANUSEIAM ANIMAIS SILVESTRES: PREVALÊNCIA E SUSCETIBILIDADE A INFECÇÕES VIRAIS, BACTERIANAS E POR PARASITAS, COM ÊNFASE NAS HANTAVIROSES", conduzido pela Dra. Elba Lemos, responsável pelo Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz. A participação no estudo envolverá responder a um questionário e a coleta de cerca de 10 ml de sangue venoso periférico, para estudo de anticorpos contra hantavírus, arenavírus e de rickettsioses, que são infecções causadas por *Coxiella burnetii*, por *Bartonella*, por *Rickettsia rickettsii*. Oportunamente, serão realizados testes para as hepatites virais (A, B e C), assim como avaliação da caderneta vacinal, com o objetivo de imunizar os susceptíveis às infecções imunopreviníveis. Exames de fezes serão disponibilizados para a pesquisa de helmintos e protozoários. As rickettsioses podem ser transmitidas dos animais para as pessoas diretamente (ex. *Coxiella* e *Bartonella*), ou através de insetos (principalmente carrapatos, no caso da *R. rickettsii*, e pulgas, no caso da *Bartonella*). Pode ocorrer doença na forma de febre e manchas na pele (*R. rickettsii*), febre e pneumonia (*Coxiella*) e febre prolongada (*Bartonella*). Hantavírus pode ser transmitido através de contato com a urina de ratos no ambiente, e pode ocorrer febre, pneumonia e/ou problemas renais. Arenavírus também são transmitidos por ratos silvestres e causam a febre hemorrágica. A participação no estudo é totalmente voluntária, podendo ser interrompida a qualquer momento e sem nenhuma forma de compensação financeira. A coleta de sangue será realizada no braço e o(a) sr.(sra.) sentirá apenas a dor da picada da agulha e no local poderá surgir uma mancha arroxeadada. Os resultados obtidos no estudo serão entregues aos participantes. Orientações de profilaxia e tratamento, quando necessários, serão dados, tudo de forma absolutamente confidencial. Os resultados desse estudo serão divulgados em reuniões e revistas científicas, sem que as pessoas que dele participem sejam listadas por nome. Concordo em participar do estudo e autorizo ainda que amostras de meu sangue sejam conservadas pelo Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses da FIOCRUZ para estudos futuros, desde que estes venham a ser autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL E CONTATO PARA ESCLARECIMENTOS:

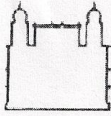
Dra. Elba Lemos
Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses
Pavilhão Rocha Lima 5º andar-Av. Brasil 4350- Rio de Janeiro
Fiocruz- Tel. 2598 4281/ 2598-4545 e-mail: elemos@ioc.fiocruz.br

Rio de Janeiro, de de 200 .

_____ assinatura

_____ nome por extenso

10.4. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/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 Hantavíroses e Ricketisioses 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