

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

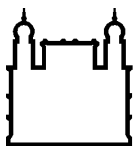
Mestrado em Programa de Pós-Graduação de Ciências de Saúde

**Evidência Sorológica e Molecular de Hantavirus em Pacientes com Síndrome
Febril Agudo atendido no Centro de Saúde Polana Caniço durante o período de
2012-2014**

RAMALHO MAXIMIANO CHAU

RIO DE JANEIRO

Julho de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde

Ramalho Maximiano Chau

Evidência Sorológica e Molecular de Hantavirus em Pacientes com Síndrome Febril Agudo atendido no Centro de Saúde Polana Caniço durante o período de 2012-2014

Tese ou dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre

Orientador (es): Prof. Dr. Eduardo Samo Gudo
Prof. Dra. Elba. R. S. de Lemos

RIO DE JANEIRO

Julho de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Chau, Ramalho Maximiano .

Pesquisa de anticorpos anti-Hantavirus em Pacientes com Síndrome Febril Aguda atendido no Centro de Saúde Polana Caniço durante o período de 2012-2014 / Ramalho Maximiano Chau. - Maputo, 2017.

56 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

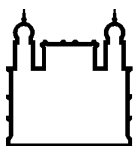
Orientador: Eduardo Samo Gudo.

Co-orientador: Elba R.S Lemos.

Bibliografia: f. 32-35

1. Hantavirus. 2. Doença febril aguda. 3. Área suburbana. 4. Maputo. 5. Moçambique. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde

Ramalho Maximiano chau

Evidência Sorológica e Molecular de Hantavirus em Pacientes com Síndrome Febril Agudo atendido no Centro de Saúde Polana Caniço durante o período de 2012-2014

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Eduardo Samo Gudo

Prof. Dra. Elba. R. S. de Lemos

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Nome - Presidente

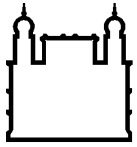
Prof. Dr. Nome

Prof. Dr. Nome

Prof. Dr. Nome

Prof. Dr. Nome

Rio de Janeiro, 13 de Julho de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela

Dedicatória

Aos meus pais, Maximiano João Chau e Balbina Lourenço Manhique, por todo apoio e amor.

A minha esposa Helena da Glória pela compreensão e paciência.

Aos meus filhos Shelton e Hawen pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

“Somos fortes quando unidos”

(Plantão)

A Deus pela vida e por todas as conquistas!

Aos meus orientadores Dr. Eduardo Samo Gudo e Dra. Elba Lemos, por serem meus orientadores na definição mais abrangente dessa palavra. Obrigado pela oportunidade e pela confiança em mim depositada.

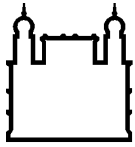
A toda família e amigos pelo incentivo, amor, carinho e compreensão.

A todos do Laboratório de Hantavirozes e Rickettsioses da FIOCRUZ pela boa convivência e troca de conhecimento.

Aos professores e colegas do curso de mestrado, que contribuíram com a construção de meus conhecimentos acadêmicos.

A todos amigos e colegas do Laboratório do Isolamento Viral do Instituto Nacional de Saúde, muito obrigado pela amizade, companheirismo e profissionalismo.

À Dra Renata, Dr Alex, Dr Jorlan, pela valiosa ajuda nos ensinamentos e na realização dos experimentos laboratoriais, bem como pelo auxílio nas análises dos dados obtidos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Evidência Sorológica e Molecular de Hantavirus em Pacientes com Síndrome Febril Agudo atendido no Centro de Saúde Polana Caniço durante o período de 2012-2014

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Ramalho Maximiano Chau

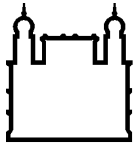
Hantavírus são vírus RNA pertencentes à família *Bunyaviridae* transmitidos por roedores silvestres de diferentes espécies. Em humanos, os hantavírus estão associados a duas síndromes clínicas: a febre hemorrágica com síndrome renal, descrita na Europa, África e Ásia e a síndrome pulmonar por hantavírus (SPH) também reconhecida como a síndrome cardiopulmonar por hantavírus (SCPH), doença emergente com descrição crescente de casos no continente americano. Na África subsaariana, a ocorrência de hantavírus é pouco estudada e a sua implicação clínica é desconhecida. O estudo teve como objectivo determinar a ocorrência de infecção por hantavírus em pacientes febris atendidos em consulta ambulatorial em um centro de atenção primária, localizada em uma área suburbana da cidade de Maputo, em Moçambique.

Um total de 200 pacientes febris com idade > 5 anos foram recrutados entre Fevereiro de 2012 e Outubro de 2014. De cada paciente, uma amostra de sangue foi colectada na fase aguda e convalescente para análise serológica utilizando proteína recombinante Andes. Anticorpos anti-hantavírus IgM e IgG foram detectados em 4

(2,0%) dos pacientes incluídos no estudo e todas as amostras IgM reactivas submetidas à RT-PCR foram negativas.

O contacto com roedores foi maior entre os participantes IgM positivos (50,0%, 2/4 vs 15,3%, 30/196). Os doentes com IgM positivos apresentaram níveis significativamente mais elevados de creatinina e ALT e níveis significativamente mais baixos de contagem de plaquetas.

Os achados deste estudo, além de sugerir, pela primeira vez, que casos febris agudos em Moçambique possam estar sendo causados por hantavírus, demonstram a necessidade de estudos adicionais que possam esclarecer o real impacto da hantavirose como importante problema de saúde pública no país, onde o tratamento de toda síndrome febril aguda é rotineiramente tratado como malária, mesmo quando o esfregaço sanguíneo se apresenta negativo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Serological and Molecular Evidence of Hantavirus in Patients with Acute Febrile Syndrome treated at the Polana Caniço Health Center during the period 2012-2014

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION THESIS IN MEDICINA TROPICAL

Ramalho Maximiano Chau

Hantavirus are RNA viruses belonging to the Bunyaviridae family transmitted by wild rodents of different species. In humans, hantaviruses are associated with two clinical syndromes: hemorrhagic fever with renal syndrome, described in Europe, Africa, and Asia, and hantavirus pulmonary syndrome (HPS) also recognized as hantavirus cardiopulmonary syndrome (SCPH), an emerging disease with an increasing description of cases in the American continent.

In sub-Saharan Africa, the occurrence of hantavirus is poorly studied and its clinical implication unknown. The objective of the study was to determine the occurrence of hantavirus infection in febrile patients seen at an outpatient clinic in a primary care center located in a suburban area of the city of Maputo, Mozambique.

A total of 200 febrile patients aged > 5 years were recruited between February 2012 and October 2014. From each patient, a blood sample was collected in the acute and convalescent phase for serological analysis using Andes recombinant protein. IgM and IgG anti-hantavirus antibodies were detected in 4 (2.0%) of the patients included in the study and all reactive IgM samples submitted to RT-PCR were negative.

The contact with rodents was higher among the positive IgM participants (50.0%, 2/4 vs 15.3%, 30/196). Patients with IgM positive had significantly higher levels of creatinine and ALT and significantly lower platelet counts.

The findings of this study, besides suggesting for the first time that acute febrile cases in Mozambique may be caused by hantavirus, demonstrate the need for additional studies that may clarify the real impact of hantavirus as an important public health problem in the country, where The treatment of any acute febrile syndrome is routinely treated as malaria, even when the blood smear is negative.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Hantavirus no mundo	1
1.2. Hantaviroses no Continente Africano	5
1.3. Aspectos Viroológicos	6
1.3.1. Classificação taxonômica, morfologia, propriedades físico-químicas e estrutura genômica	6
1.3.2. Replicação Viral.....	9
1.4. Epidemiologia.....	11
1.4.1. Transmissão	11
1.4.2. Reservatórios.....	12
1.5. Aspectos Patogênicos.....	13
1.6. Aspectos Clínicos.....	14
1.7. Diagnóstico Laboratorial.....	15
1.8. Tratamento.....	16
1.9. Controle e Prevenção.....	16
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJECTIVO.....	19
3.1. Objectivo Geral	19
3.2. Objectivo Específicos	19
4. METODOLOGIA DO ESTUDO	19
4.1. Desenho de estudo	19
4.2. Local do estudo.....	20
4.3. Critério de inclusão e exclusão	21
4.3.1. Critério de inclusão	21

4.3.2. Critério de exclusão	21
5. TAMANHO DA AMOSTRA E DURAÇÃO DO ESTUDO	21
5.1. Colheita e transporte de amostras	22
5.2. O diagnóstico serológico	22
5.3. Técnica molecular	23
5.4. Análise de dados.....	24
5.4.1. Considerações éticas	25
6. RESULTADOS.....	26
7. DISCUSSÃO	30
8. CONCLUSÕES	34
9. PERSPECTIVA FUTURAS	35
10. BIBLIOGRAFIA.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Mapa do continente africano, mostrando os locais da identificação molecular de hantavíruses indígenas. (7).....	6
Figura 1.2: Representação esquemática de vírus da família Bunyaviridae, mostrando os segmentos do genoma complexado às proteínas do nucleocapsídeo. Este e a polimerase encontram-se envolvidos pelo envelope lipídico, que contém as glicoproteínas G1 e G2 (12)	7
Figura 1.3: Estrutura genômica dos hantavírus (1)	8
Figura 1.4: Ciclo de replicação de hantavírus.	10
Figura 1.5: Modo de transmissão de hantavirose (7)	11
Figura 1.6: Representação geográfica da área de estudo	20
Figura 1.7: Fluxograma de recrutamento dos participantes do estudo e diagnóstico laboratorial.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Principais Hantavírus causadores de doença humana (13).....	3
Tabela 1.2: Hantavírus identificados no continente Africano	5
Tabela 1.3: Características sócio-demográficas dos pacientes atendidos em ambulatório no centro de saúde de Polana Caniço no ano 2012-2014.....	27
Tabela 1.4: Resultado laboratorial dos quatro pacientes com evidência sorológica de infecção por hantavírus que foram atendidos em ambulatório no centro de saúde da Polana Caniço (2012-2014).....	28
Tabela 1.5: Características Laboratoriais dos pacientes atendidos no ambulatório no centro de saúde de Polana Caniço (2012-2014)	29

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
ANAJV	Vírus Anajatuba
ANDV	Vírus Andes
ARAV	Vírus Araraquara
AZGV	Vírus Azagny
BAYV	Vírus Bayou
BCCV	Vírus BlackCreek Canal
BOWV	Vírus Bowé
CASV	Vírus Castelo dos Sonhos
CHOV	Vírus Choclo
DO	Densidade óptica
DOBV	Vírus <i>Dobrava – Belgrade</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático/ Enzyme-linkedImmunosorbentAssay
FHSR	Febre Hemorrágica com Síndrome Renal

FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
Gc	Glicoproteína c
Gn	Glicoproteína n
HTNV	Vírus Hantaan
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
JUQV	Vírus Juquitiba
KDa	Kilodáltons
KILV	Vírus Kilimandjaro
LANV	Vírus Laguna Negra
LECV	Vírus Lechiguanas
MGBV	Vírus Magboi
MGLV	Vírus Monongahela
MOUV	Vírus Mouyassue
NYV	Vírus New York
ORNV	Vírus Oran
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

SANGV	Virus Sangassou
SEOV	Virus Seoul
SNV	Virus Sin Nombre
SPH	Síndrome Pulmonar por Hantavírus
TGNV	Virus Tangaya
TIGV	Virus Tigray
ULUV	Virus Uluguru

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hantavirus no mundo

Em todo mundo, muitas viroses emergentes preocupam as autoridades sanitárias, pois surgem como importantes problemas de saúde pública em áreas urbanas e também em áreas rurais. Hantavirose é um grupo destas doenças, amplamente distribuídas na Europa, Ásia, nas Américas, e mais recentemente na África, causadas por diversos vírus do género *Hantavírus*, pertencentes à família *Bunyaviridae*, que diferentes dos outros membros desta família não são transmitidos por artrópodes (1).

Os hantavírus são importantes causadores de doenças graves em humanos, que se mantêm na natureza a partir da transmissão cíclica entre roedores silvestres e sinantrópicos infectados de forma persistente, uma característica distinta que os diferencia dos demais vírus da família *Bunyaviridae* que são transmitidos por artrópodes (8). Actualmente são conhecidas duas formas clínicas da doença: a Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) e a emergente Síndrome Pulmonar por Hantavírus (SPH), também denominada Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (SCPH)(3). É pertinente ressaltar que estudos recentes questionam essa separação já que as manifestações clínicas de alguns casos apresentaram manifestações renais e pulmonares no mesmo paciente, reforçando a tendência de unificação das síndromes (4).

A denominação FHSR foi recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para designar um grupo de doenças infecciosas agudas com manifestações hemorrágicas e disfunção renal, cujos primeiros registos datam do século X. Os primeiros casos de doença humana causada por hantavírus foram reconhecidos na década de 1950 na Coreia do Sul, onde mais de 3.000 casos foram registados. No entanto, a identificação deste novo vírus somente foi possível na década de 1970 com o isolamento do vírus que foi denominado Hantaan, nome originado do rio Han, localizado em um vilarejo sul coreano onde ocorreram os casos confirmados de 1951 (2,5).

A partir da década de 1980, com o desenvolvimento de diversos estudos foi possível verificar presença de hantavírus associado a doenças similares na Europa e na Ásia, onde três outros vírus relacionados antigénicamente ao Hantaan, os vírus

Puumala, Seoul e o Prospect Hill, foram isolados em roedores silvestres e urbanos (4,5). Posteriormente, o vírus Thailand 749 foi proposto como um novo vírus do gênero *Hantavirus* e em seguida, foi identificado o vírus Dobrava, considerado o responsável por acarretar uma forma mais grave da FHSR (7). Como regra, é possível observar que a designação de cada hantavírus geralmente está associado ao local em que foi detectado pela primeira vez (3).

Desde sua primeira descrição na Coreia no Sul, a FHSR historicamente tem recebido variadas denominações em diferentes regiões do mundo, como nefrose e nefrite hemorrágica na antiga União Soviética, febre songo ou febre hemorrágica epidémica na China, febre hemorrágica coreana na Coreia, nefropatia epidémica na Escandinávia, nefrite epidémica ou febre hemorrágica epidémica ou nefrite dos Balcãs na Europa, e febre hemorrágica epidémica no Japão (3,4). Somente na década de 1980 a FHSR passou a ser reconhecida também em outras regiões do Velho Mundo, incluindo a África (2,6). Com uma incidência anual de 150.000 a 2000.000 casos, a FHSR tem sido identificada de forma quase exclusiva na Europa, Ásia, China e mais recentemente, também na África (5,10).

O primeiro isolamento do vírus associado com a FHSR foi realizado em 1976 em amostras de roedor silvestre e o primeiro isolamento viral em amostra humana foi realizado a partir da urina de um soldado grego que se infectou na Grécia, na qual foi possível identificar um serótipo viral similar ao vírus Hantaan (11,12).

Em relação à SPH, foi detectada pela primeira vez em 1993 no continente americano, mais precisamente no sudoeste norte-americano, embora na década 1980 diversos estudos conduzidos já demonstrassem evidências de circulação de hantavírus, tanto em população humana quanto em roedores (1). Caracteristicamente e de forma diferente da FHSR, a SPH foi descrita como uma doença febril associada à insuficiência respiratória aguda, mais frequente em adultos jovens, com uma elevada letalidade (70%). Os estudos conduzidos possibilitaram a identificação de um novo membro do gênero *Hantavirus*, o Sin Nombre, associado ao roedor silvestre *Peromyscus maniculatus*, um hantavírus emergente causador de SPH (4,6).

A partir da identificação dos primeiros casos da SPH, incluindo o surto notificado no Brasil, no estado de São Paulo também em 1993, um grande número de novos hantavírus nas últimas décadas (Tabela 1.1.) associado ou não à doença

humana passaram a ser caracterizados. Apesar dos questionamentos, considerando a dificuldade no isolamento em cultivo celular e a não visualização de efeito citopático nas infecções *invitro* por muitos hantavírus, entre outros factores, o Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) estabeleceu que o conceito de espécie deveria considerar quatro critérios: (i) estar associado a uma única espécie ou subespécie de roedor reservatório primário (nicho ecológico), (ii) apresentar no mínimo 7% de diferença na sequência de aminoácidos presentes nas glicoproteínas de superfície (G1 e G2) e na nucleoproteína, (iii) apresentar no teste de neutralização cruzada, uma diferença de no mínimo quatro vezes, (iv) não formar rearranjos naturais com outras espécies de hantavírus (9). Desta forma, actualmente somente 24 hantavírus foram classificados como espécie pelo ICTV (10). Não obstante a dificuldade de se caracterizar uma espécie viral, a complexa taxonomia dos roedores hospedeiros, com base na citogenética e na análise molecular, através das sequências de DNA mitocondrial, confirma a dificuldade de se atender aos critérios estabelecidos pelo ICTV. Adicionalmente, com o avanço das pesquisas em diversas regiões do mundo, novos hantavírus têm sido detectados também em espécies de mussaranhos e toupeiras na Eurásia, África, EUA e China, além dos roedores silvestres que, até recentemente, eram considerados os únicos hospedeiros naturais dos hantavírus (10)

Tabela 1.1: Principais Hantavírus causadores de doença humana (13)

Vírus	Doença	Distribuição Geográfica
Anajatuba (ANAJV)	SPH ^a	Brasil
Andes (ANDV)*	SPH	Argentina, Chile e Uruguai
Araraquara (ARAV)	SPH	Brasil
Bermejo (BMJV)	SPH	Argentina, Bolívia
Bayou (BAYV)*	SPH	EUA
Black Creek Canal (BCCV) *	SPH	EUA, Venezuela e Peru
Castelo dos Sonhos (CASV)	SPH	Brasil

Central Plata	SPH	Uruguai
Choclo (CHOV)	SPH	Panamá
Dobrava – Belgrade (DOBV)		Balcãs, Estônia, Alemanha e Rússia
Hantaan	FHSR ^b	China, Coréia, Japão e Rússia
Juquitiba (JUQV)	SPH	Brasil
Laguna Negra (LANV) *	SPH	Paraguai, Bolívia, Brasil, Argentina
Lechiguanas (LECV)	SPH	Argentina Central
Maripa (MARV)	SPH	Guiana Francesa
Monongahela (MGLV)	SPH	EUA, Canadá
Oran (ORNV)	SPH	Nordeste da Argentina
Rio Mamore (RIOMV)	SPH	Bolívia e Brasil
Sin Nombre (SNV) *	SPH	Canadá e EUA
New York (NYV) *	SPH	Canadá e leste EUA
Puumala	FHSR	Norte e noroeste da Europa
Saaremaa	FHSR	Leste da Europa
Seoul (SEOV) *	FHSR	Global
Tunari (TUNV)	SPH	EUA, América do Sul

^aSPH – síndrome pulmonar por hantavírus, ^bFHSR–febre hemorrágica com síndrome renal *Hantavirus reconhecidos oficialmente pela ICTV. Obs. Muitas abreviações não foram designadas oficialmente pelo ICTV, sendo passível de mudanças.

1.2. Hantavirose no Continente Africano

O continente africano, após a identificação do primeiro vírus, denominado Sangassou (SANGV) isolado de um roedor silvestre da espécie *Hylomyscus* capturado em uma aldeia chamada Sangassou, na floresta equatorial da Guiné, África ocidental, tornou-se o palco de uma intensa busca de hantavírus (Tabela 1.2.) e seus hospedeiros (7). Assim, novos hantavírus foram subsequentemente identificados em outros animais silvestres como, musaranhos e morcegos. Musaranhos do gênero *Crocidura theresae* cujo vírus caracterizado passou a ser denominado de Tanganya (TANGV). Com estes novos achados diversos estudos soro epidemiológicos foram estimulados (7).

Desde então, vários outros hantavírus transmitidos por musaranhos foram identificados em África (Figura 1.1). O vírus Azagny (AZGV) foi detectado no Oeste Africano na Costa de Marfim envolvendo musaranhos pigmeu. Análises filogenéticas mostraram que AZGV compartilha uma ascendência comum com TANGV. O vírus Bowe (BOWV) foi detectado no músculo intercostal de um musaranho capturado em Guiné (3). Muito recentemente hantavírus adicionais tais como o vírus Azagny e vírus Magboi foram encontrados nos países vizinhos da Costa de Marfim e Serra Leoa respectivamente confirmando que a África Ocidental é uma região onde as infecções por hantavírus devem ser consideradas (4,7).

Tabela 1.2: Hantavírus identificados no continente Africano

Vírus	Reservatório	Distribuição geográfica	Referência
Sangassou	Roedor	Guiné	(7,14)
Tanganya	Musaranho	Guiné	(7)
Azagny	Musaranho	Costa de Marfim	(7)
Mouyassue	Morcego	Costa de Marfim	(7)
Bowe	Musaranho	Serra-Leoa	(7)
Magboi	Morcegos	Serra-Leoa	(7)
Tigray	Musaranho	Etiópia	(7)

Kilimadjaro	Mussaranho	Tanzânia	(7)
Uluguru	Mussaranho	Tanzânia	(7)

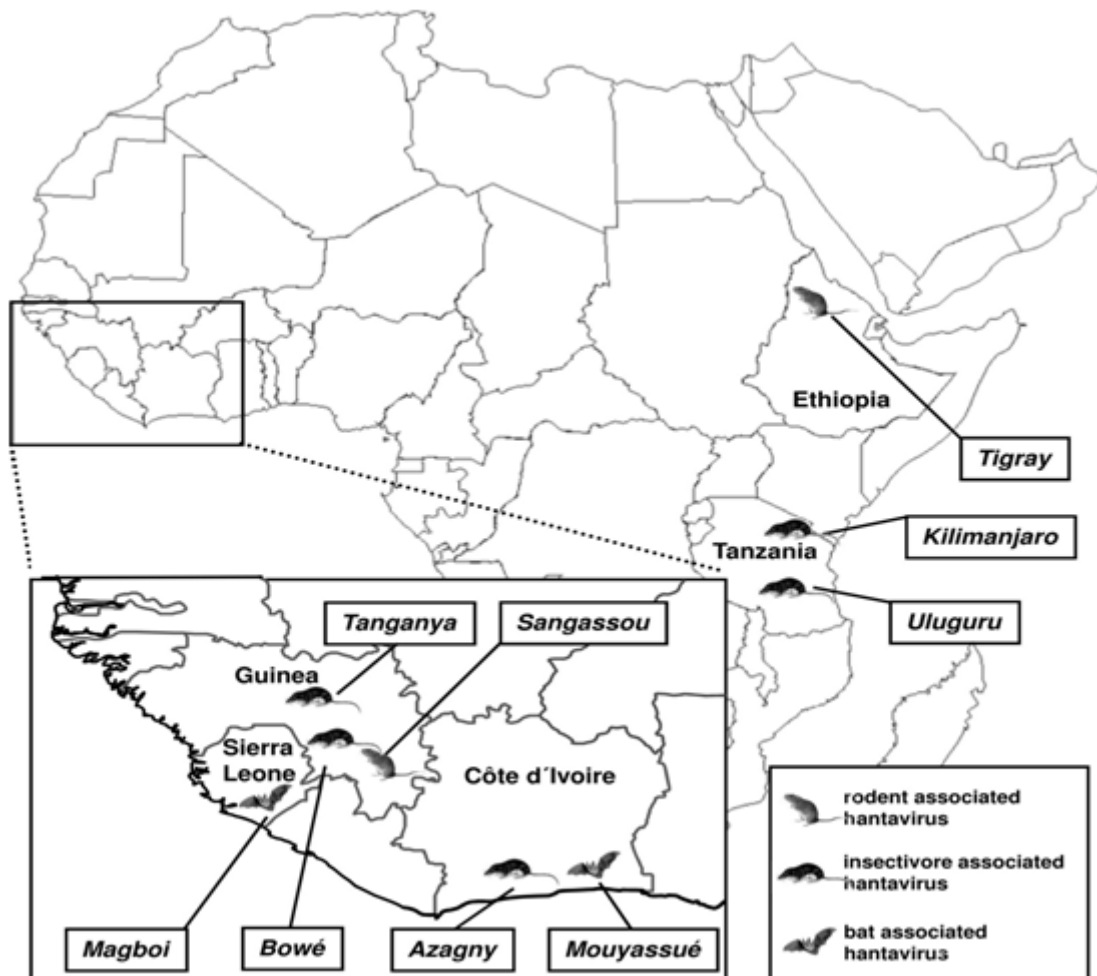


Figura 1.1: Mapa do continente africano, mostrando os locais da identificação molecular de hantaviruses indígenas. (7)

1.3. Aspectos Viroológicos

1.3.1. Classificação taxonômica, morfologia, propriedades físico-químicas e estrutura genômica

Os hantavírus são vírus esféricos, de 80 a 120 nm de diâmetro, com envelope lipoprotéico, cujo genoma é constituído por uma molécula de RNA (12 a 13 kb) de fita simples com polaridade negativa, trissegmentado, contendo um segmento grande (L), de aproximadamente 6.500 nucleotídeos, um segmento (M), com 3.600 a 3.800

nucleotídeos e um segmento pequeno (S), com cerca de 1.700 a 2.100 nucleotídeos. O segmento L codifica uma RNA polimerase viral RNA dependente e o segmento genômico S codifica a proteína do nucleocapsídeo que é o antígeno viral predominante cujos epitopos reagem cruzadamente com diversos hantavírus, o que possibilita o reconhecimento viral (Figura 1.2). Quanto ao segmento M codifica a poliproteína que é clivada nas proteínas de superfície viral G1 de 70 kDa e G2 de 58 kDa que são reconhecidas pelos anticorpos neutralizantes (1,8)

Diferentemente de outros vírus RNA com genoma segmentado, como o vírus de influenza e o rotavírus, nos hantavírus os rearranjos do genoma viral entre os diferentes genótipos são raramente observados (7). Embora existam diferentes hantavírus em diversas regiões do mundo mantidos em seus inúmeros animais reservatórios, especialmente, os roedores silvestres, os hantavírus apresentam elevada homologia na organização de suas sequências nucleotídicas (12)

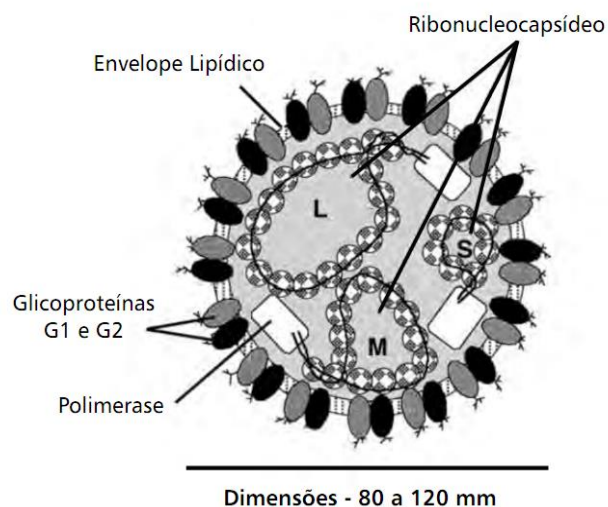


Figura 1.2: Representação esquemática de vírus da família Bunyaviridae, mostrando os segmentos do genoma complexado às proteínas do nucleocapsídeo. Este e a polimerase encontram-se envolvidos pelo envelope lipídico, que contem as glicoproteínas G1 e G2 (12)

Regiões não codificadoras terminais (NCR) 5' e 3' altamente conservadas (AUCAUCAUC) e complementares entre si têm sido encontradas nos três segmentos genômicos dentro de um mesmo gênero da família *Bunyaviridae*, mas diferem entre

os vírus dos distintos gêneros (10). Estas sequências complementares são formadas por cerca de 40 a 50 nucleotídeos terminais que permitem a formação de estruturas estáveis em formato de raquete, *pan-handle*, por meio de pareamento de base, que provavelmente conferem o aspecto circular do RNA observado em microscopia electrónica, característica peculiar da família *Bunyaviridae*. Esta região de complementaridade, provavelmente, tem uma importante função na transcrição, replicação e empacotamento de partículas similares a outros vírus que apresentam a mesma estrutura (8,10,14).

A estratégia de tradução de hantavírus é considerada a mais simples entre os cinco gêneros da família *Bunyaviridae*. Todos os três segmentos codificam somente uma proteína no sentido complementar do genoma do vírus. O segmento L codifica a polímerase viral (proteína L) com aproximadamente 2.152 a 2.156 aminoácidos (246-247 KDa). O segmento M codifica uma única proteína de 1.132 a 1.148 aminoácidos (125-127 KDa), que é pós-traducionalmente clivada nas proteínas percussoras das glicoproteínas virais do envelope, G1 e G2, com 648-658 (68-76 KDa) e 486-490 (52-58 KDa) aminoácidos, respectivamente. O segmento S codifica a proteína N do nucleocapsídeo com 428-433 aminoácidos (49-51KDa) (5). Não há evidência de proteína não estrutural, a qual está presente, nos demais gêneros da família (Figura 1.3) (17)

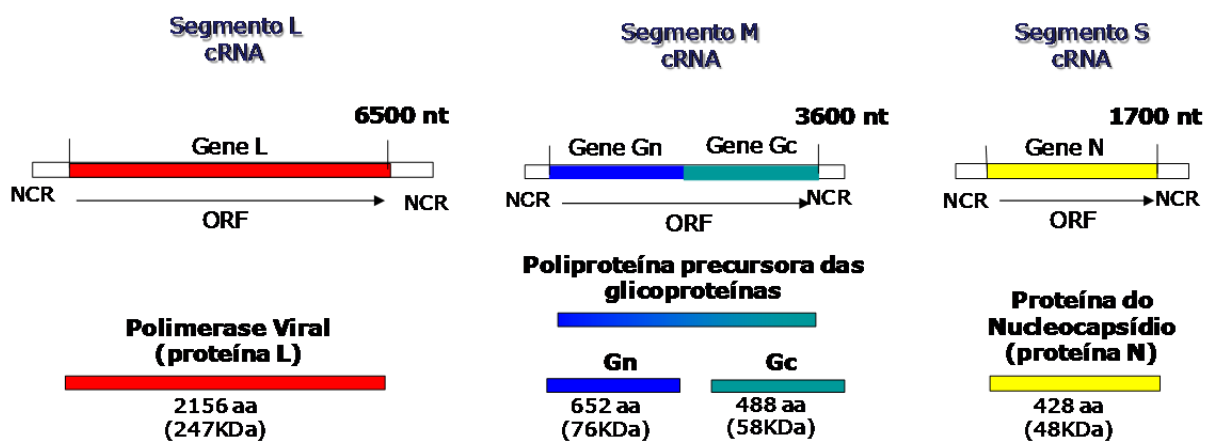


Figura 1.3: Estrutura genômica dos hantavírus (1)

Por ser a proteína mais conservada dos hantavírus e a mais imunogênica para humanos, a nucleoproteína N, codificada pelo segmento S, é a primeira escolha para

ser utilizada como reagente em diagnóstico visando à detecção desta infecção (16,17).

A análise comparativa entre sequências nucleotídicas do segmento S dos hantavírus revela sequências variáveis, tanto na sua composição quanto na extensão, principalmente na região não codificadora (NCR), na extremidade 3'. O segmento M apresenta uma fase aberta de leitura, as cadeias oligossacarídicas são componentes essenciais para o correcto enovelamento ou estrutura de glicoproteína e participam em muitas reacções de reconhecimento de receptores e ligantes, podendo também determinar o reconhecimento das proteínas do envelope viral pelos componentes do sistema imune do hospedeiro. Portanto diferenças no padrão de glicosilação poderiam estar relacionadas às diferenças patogénicas das cepas virais (10,16,18). As posições de resíduos de cisteína nas proteínas G1 e G2 também são conservadas, assim como os resíduos de prolina, indicando uma estrutura tridimensional altamente conservada para proteína (19).

Com relação ao segmento L, apesar da extrema variabilidade na sequência nucleotídica, comparações das sequências de aminoácidos têm demonstrado que há uma conservação na estrutura primária de proteína precursora, podendo ser resultado da adaptação evolutiva ao *codon-usage* do hospedeiro (16,20).

1.3.2. Replicação Viral

A replicação de hantavírus, semelhante a todos integrantes da família *Bunyaviridae*, ocorre exclusivamente no citoplasma das células hospedeiras (Figura 1.4). A replicação se inicia com a fusão da partícula viral, mediada pela integração de uma ou ambas as proteínas integrais do envelope viral (Gn e Gc).

A penetração ocorre por acoplamento dos vírus a receptores celulares específicos presentes em células endoteliais, macrófagos e plaquetas-integrinas $\beta 3$ (hantavírus patogénicos) e integrinas $\beta 1$ (não patogénicos), com subsequente endocitose. Os núcleos capsídios são introduzidos no citoplasma por fusão do vírion com a membrana endossomal, iniciando-se posteriormente a transcrição dos genes virais para a produção das proteínas que irão constituir parte dos novos vírions. Essas partículas recém-formadas são então transportadas para vesículas secretoras da

membrana citoplasmáticas, liberadas por exocitose, considerando que o envoltório lipídico viral é derivado do complexo de golgi da célula hospedeira (21,22).

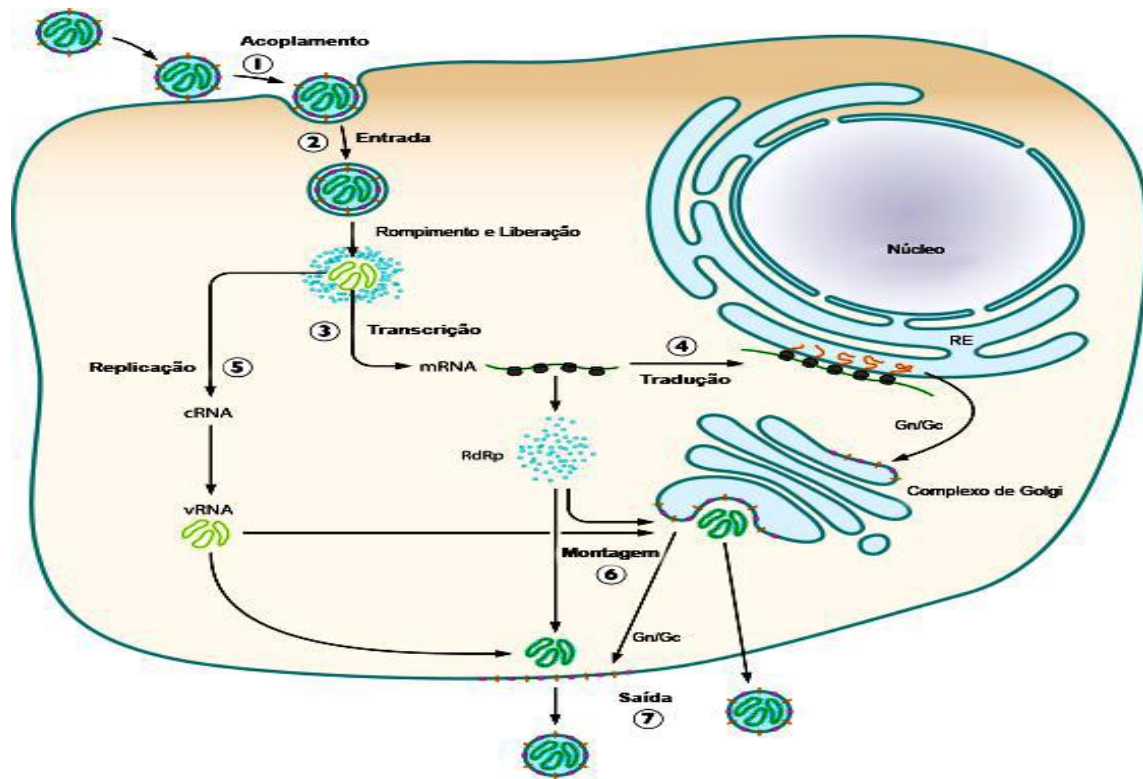


Figura 1.4: Ciclo de replicação de hantavírus.

- 1 - Acoplamento do vírus a receptores na superfície celular;
- 2 - Penetração viral via endocitose mediada pelos receptores e englobamento do vírus, seguida da fusão da membrana do envelope viral com a membrana endossomal, permitindo a liberação dos ribonucleocapsídeos e da RNA polimerase dependente de RNA no citoplasma celular;
- 3 - Transcrição primária
- 4 - Tradução do RNAm em proteínas virais utilizando a maquinaria do hospedeiro;
- 5 - Replicação e amplificação do material genômico;
- 6 - Maturação dos vírions no complexo de Golgi seguido e membrana plasmática;
- 7 - Saida por brotamento em vesículas no complexo de Golgi seguido por exocitose ou brotamento pela membrana citoplasmática e retículo endoplasmático (11,24);

1.4. Epidemiologia

Os hantavírus associados com a doença humana são mantidos na natureza em pequenos roedores reservatórios que acidentalmente infectam o homem na dependência de diversos factores relacionados ao roedor, ao ambiente e à actividade atópica, esta última geralmente associada com a invasão humana no habitat dos roedores, considerando que a distribuição geográfica das doenças causadas pelos hantavírus é dependente das espécies de roedores existentes.

1.4.1. Transmissão

Os hantavírus associados com doença humana são mantidos em natureza pela infecção crónica de roedores. A exposição humana (Figura 1.5) ocorre principalmente, através da inalação de aerossóis contendo partículas virais procedentes de urina, fezes ou saliva de roedores silvestres infectados (26). Outra forma de transmissão pode ser por mordedura de animais contaminados, inoculação em pele ou mucosas apresentando solução de continuidade ou ainda ingestão de água ou alimentos contaminados pelos vírus (26).

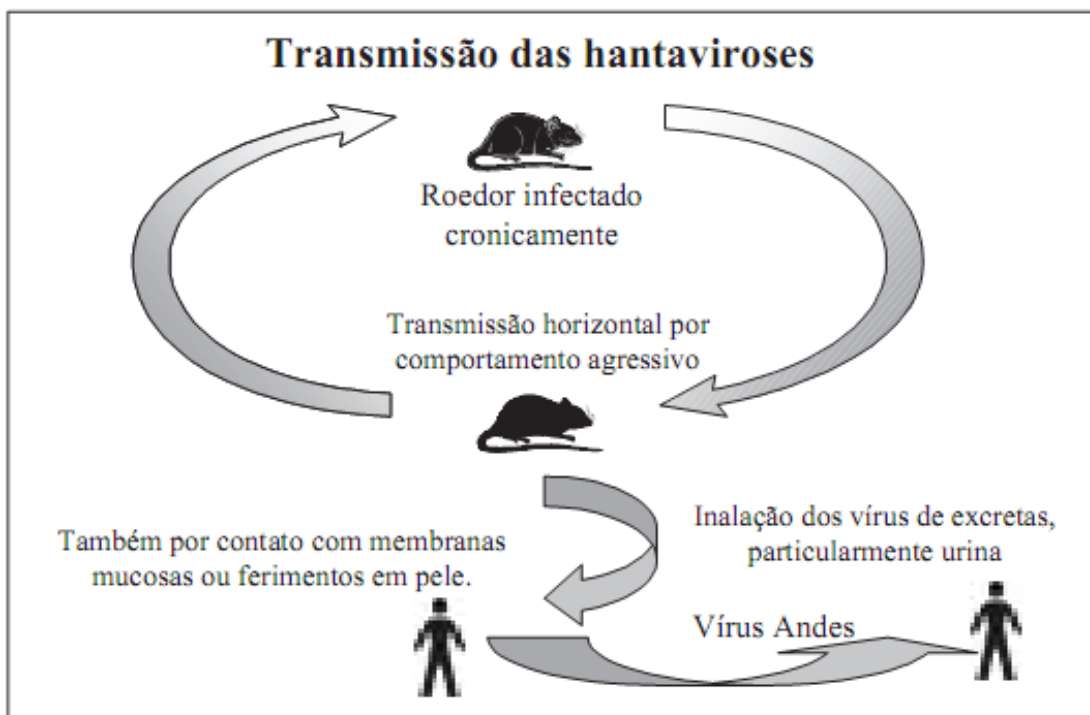


Figura 1.5: Modo de transmissão de hantavirose (7)

1.4.2. Reservatórios

Embora novos reservatórios de hantavírus venham sendo descritos nos últimos anos, como mussaranhos, quirópteros e insectívoros, os hantavírus relacionados com doença humana, até a presente data, são transmitidos por roedores da ordem Rodentia das famílias Muridae e Cricetidae. Os principais reservatórios primários da FHSR do Velho Mundo são os roedores das subfamílias Arvicolinae e Murinae, enquanto que os roedores silvestres da subfamília Sigmodontinae, da família Cricetidae, são os roedores envolvidos com a SPH (24,25). Esses roedores vivem em diversos lugares em todo mundo, se abrigam em buracos ou fendas no solo, de baixo de troncos, em árvores, em ninhos construídos no solo, em arbustos ou árvores. De hábitos noturnos, as fêmeas podem gerar vários ninhos em cada ano. É provável que a maioria das espécies viva menos de dois anos (6).

Em relação à distribuição geográfica, os murineos são endêmicos na Eurásia, com excepção das espécies *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus* que foram introduzidos no Novo Mundo pelos colonizadores europeus. Os roedores da subfamília Arvicolinae apresentam ampla distribuição no hemisfério norte, ocorrendo na Eurásia até a América do Norte, enquanto os Sigmodontinae só ocorrem no continente americano. Em relação aos hospedeiros de hantavírus causadores da SPH, os roedores da subfamília Sigmodontinae estão associados a ambientes silvestres e rurais, embora alguns tenham predilecção por um habitat particular (27).

A distribuição viral pode ocorrer em toda área de abrangência da espécie reservatória ou pode ser restrita a uma pequena área geográfica. Muito embora cada hantavírus esteja, predominantemente, associado a um roedor específico em uma determinada localidade, infecções em outros hospedeiros pelo mesmo vírus podem ocorrer através do fenómeno de *spillover* ou transmissão interespecífica (28)

Casos de hantavirose têm sido associados às características populacionais dos roedores, como tamanho populacional, actividade reprodutiva, maturação sexual entre outros, bem como características climáticas, como precipitação e temperatura, possibilitando a ocorrência de surtos de doença. Características comportamentais

dos roedores também garantem a manutenção do vírus no ambiente. Estudos mostram que encontros agonísticos por disputa de território e alimento, por exemplo, podem ser importante via de transmissão, considerando a presença de mordidas e arranhões principalmente em machos, gênero que apresenta maior prevalência de infecção viral (6,8).

Em áreas peri-urbanas, onde há presença de habitações humanas próximas às áreas rurais, há uma facilidade de se encontrar roedores, pois os mesmos invadem estes locais em busca de alimento ou fugindo de queimaduras nas plantações. A grande expansão das áreas urbanas, também possibilita o encontro dos roedores com humanos, favorecendo conseqüentemente a transmissão de hantavíruses (1).

As hantavíruses ocorrem com mais frequência em indivíduos do sexo masculino e a faixa etária mais acometida é a de 20 aos 50 anos. Como doença relacionada às atividades laborais, as hantavíruses podem ocorrer em profissionais que executam atividades agrícolas, militares durante as atividades em campo, associadas com desmatamento e reflorestamento (29)

1.5. Aspectos Patogênicos

Os hantavírus infectam as células endoteliais e as plaquetas a partir da ligação com as $\beta 3$ integrinas, moléculas receptoras abundantes nestas células, onde replicam, desencadeando o processo infeccioso nos capilares de vários órgãos. Os hantavírus considerados não patogênicos se ligam a um tipo específico de integrinas chamadas $\beta 1$. Apesar da patogênese ainda ser mal compreendida, a disfunção vascular e a intensa resposta de linfócitos citotóxicos são, pelo menos em parte, responsáveis pelo desenvolvimento das manifestações clínicas (3)

Os estudos histopatológicos em casos fatais tanto na FHSR quanto na SPH, têm demonstrado, de uma forma geral, extensa distribuição viral não somente no tecido renal e pulmonar, mas também em tecido cardíaco, além do sistema nervoso, baço, pâncreas adrenais, músculo esquelético, entre outros (3,12).

1.6. Aspectos Clínicos

As hantavirose apresentam manifestações clínicas variáveis, tanto com relação ao órgão alvo, quanto à sua gravidade, na dependência, principalmente da espécie de hantavírus causadora da doença. A FHSR tem sido reconhecida em diversas regiões do mundo, as infecções virais iniciam-se nas células endoteliais da microvascularização dos pulmões, após a replicação viral, há uma disseminação do vírus por via linfo-hemática para outros órgãos e tecidos, o período de incubação varia de 7 a 42 dias e infecções subclínicas ou oligossintomáticas não se mostram incomuns. Classicamente, divide-se a evolução clínica em cinco fases: febril, hipotensiva, oligúrica, diurética e convalescência. O início mostra-se com febre elevada, calafrios, cefaleia, fotofobia, mialgia, dor abdominal, vômitos, náuseas (1).

Manifestações gastrointestinais e dor abdominal podem ser observadas, sendo mais comuns na nefrite epidêmica, assim como sinais de irritação meníngea com líquido cérebro espinal normal e infiltrado pulmonar também tem sido relatado, mostrando a diversidade do quadro clínico da FHSR (6).

Na SPH, a infecção pode variar desde uma forma assintomática a quadros clínicos clássicos de alta letalidade (40-60%), dependendo do genótipo viral envolvido na transmissão. Após um período de incubação médio de 15-18 dias, que pode variar de 5 a 42 dias, o paciente desenvolve um quadro semelhante à influenza (febre e complicação pulmonar) evoluindo, na forma clássica, rapidamente para forma respiratória grave (26). De um modo geral a SPH apresenta três fases clínicas e distintas: a fase inicial ou prodrômica, a fase cardiopulmonar e a fase de convalescente. A fase prodrômica, que dura geralmente de três a seis dias, é caracterizada por febre, mialgia, mal-estar geral, cefaléia, dor nas costas, náuseas, vômito ou outra manifestação gastrointestinal, como dor abdominal e diarreia, no entanto não há observação de manifestações respiratórias (1,23).

A fase cardiopulmonar, que se inicia 4-12 horas após a instalação da tosse sem expectoração (tosse seca), se caracteriza por taquipnéia, dispneia e hipoxemia. Nas formas mais graves há evolução para insuficiência respiratória aguda associada com hipotensão, edema pulmonar não cardiogênico, e possível manifestação hemorrágica. Nesta fase ocorre a saída de fluidos e das proteínas para o parênquima

pulmonar, ocorrendo em consequências, dispneia e taquicardia, que pode culminar com insuficiência respiratória aguda (26,27).

Os pacientes que sobrevivem evoluem para uma fase diurética na qual há reabsorção do líquido, por último o período de convalescença pode durar meses (1).

As manifestações clínicas nas crianças são as mesmas observadas nos adultos, em geral a FHSR e SPH, confirmando a assertiva de que ambas as síndromes são, parcialmente, sobrepostas (2,6).

1.7. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico pode ser com base nos testes laboratoriais inespecíficos e específicos. O hemograma mostra na maioria dos casos hemoconcentração (hematócrito > 45%), leucocitose com desvio para esquerda, trombocitopenia, além da presença de linfócitos atípicos (> 10%) e achados bioquímicos que demonstram elevação dos níveis séricos das enzimas hepáticas - alanina transaminase (ALT) e aspartatotransaminase (AST) - e a desidrogenase láctica (DHL). A radiografia de tórax, especialmente nos casos da SPH, apresenta, na maioria dos pacientes, um infiltrado intersticial difuso, uni ou bilateral, com edema pulmonar e pleural durante a fase cardiorespiratória, devido ao aumento da permeabilidade vascular (2,15).

Quanto ao diagnóstico específico, as técnicas laboratoriais disponíveis são, além dos testes sorológicos e moleculares, a imunohistoquímica e o isolamento viral que deve ser realizado em condições de biossegurança nível 3.

Dentre os testes sorológicos disponíveis para a detecção de anticorpos da classe IgM e IgG utilizados tanto no diagnóstico de casos suspeitos quanto nos inquéritos, destaca-se o teste imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-ELISA*), desenvolvido a partir da nucleoproteína viral que é a proteína mais conservada e mais imunogênica dos hantavírus (29). Os anticorpos da classe IgM aparecem durante os primeiros dias da doença e podem ser detectados até cerca de 60 dias após o início de quadro infeccioso. Quando não há possibilidade de se definir o diagnóstico sorológico a partir de uma única amostra, uma segunda amostra deve ser colhida com intervalo de tempo de duas a três semanas após a colheita da primeira. A positividade do teste é dada quando há detecção de anticorpos IgM em amostra única ou quando, em duas amostras ocorra a soroconversão, ou seja quando

na segunda amostra de soro são detectados anticorpos IgG com diferença de títulos igual ou maior do que quatro vezes os títulos obtidos na primeira (6,25,27). A pesquisa de anticorpos da classe IgG pode ser realizada em inquéritos sorológicos e na investigação de infecções passadas. Além do ELISA, existem outros testes serológicos como o teste de imunofluorescência indirecta, teste de neutralização por redução de placa, hemaglutinação passiva e Western blot (1).

1.8. Tratamento

Embora não exista tratamento específico para a hantavírose, medidas clínicas na fase prodrômica com monitoramento em unidade de terapia intensiva são geralmente necessárias. Estudos realizados com ribavirina como terapêutica anti-hantavírus em pacientes e em modelos animais *in vivo* têm demonstrado diminuição da mortalidade em sete vezes apenas nos casos da FHSR (6) . Estudo sobre a utilização da ribavirina em casos da SPH ainda não tem resultados conclusivos (21,26). O tratamento dos casos leves se baseia em medidas de manutenção do estado geral e no acompanhamento de sinais vitais dos doentes.

1.9. Controle e Prevenção

Considerando que os roedores silvestres são os portadores de hantavírus, as medidas de controlo devem ser direccionadas para que se evite o contacto com esses roedores e suas excretas. É importante lembrar que a erradicação do reservatório é inviável e incorrecta dada abundância das espécies hospedeiras e da sua grande dispersão e principalmente, pelo dano ecológico que tal medida acarretaria (1,29).

Neste sentido, todos os indivíduos que frequentemente estão expostos a roedores devem ser orientados sobre as medidas de prevenção e de protecção individual tais como: (i) eliminação de roedores em domicílios; (ii) construção de edifícios adequados, tanto para moradia quanto para acondicionamento de alimentos, visando evitar o acesso de roedores; (iii) colocação de iscas contendo substâncias anticoagulantes para evitar instalação e proliferação desses mamíferos; (iv) limpeza de áreas infestadas com roedores utilizando equipamentos de protecção individual; (v) escolha adequada de locais e desenvolvimento das actividades externas, sejam ocupacionais ou recreativas, evitando contacto com os roedores e suas excretas (1).

2. JUSTIFICATIVA

As doenças infecciosas representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade na África sub-Sahariana, incluindo Moçambique. No entanto, devido à falta de capacidade diagnóstica para muitos agentes infecciosos e tendo em conta que a malária representa uma das principais causas de síndrome febril aguda, uma prática comum é tratar e manusear toda síndrome febril aguda como malária, mesmo quando os resultados da testagem para a malária são negativos. Neste contexto, a possibilidade de circulação de outros agentes infecciosos que determinam um quadro clínico semelhante à malária precisa ser considerada, como por exemplo, os hantavírus, agentes virais transmitidos a partir de excretas de roedores infectados. Com escassas informações sobre a presença de hantavírus no continente africano, basicamente nos países da região sub-Sahariana de África, não existem dados disponíveis da presença de infecção por hantavírus em Moçambique.

A nossa hipótese é que os hantavírus podem estar associados com casos de doença febril aguda em Moçambique.

De facto, os poucos estudos conduzidos na África sub-Sahariana sugerem que a malária está sendo super estimada e que uma proporção significativa de doença febril aguda pode ser causada por patógenos, como os hantavírus, que freqüentemente são negligenciados

Este estudo é inédito em Moçambique por se tratar da primeira investigação sobre a ocorrência de hantavirose a ser conduzido no território moçambicano. Além de fornecer informação importante em relação à circulação destes vírus no país, permitirá gerar resultados que irão contribuir para o refinamento dos algoritmos utilizados no manuseio da síndrome febril aguda, na tomada de decisão diagnóstica e terapêutica e para o estabelecimento de vigilância laboratorial para hantavírus em Moçambique.

3. OBJECTIVO

3.1. Objectivo Geral

- Determinar a presença de infecção por hantavírus em pacientes, com síndrome febril aguda, atendido no Centro de Saúde Polana Caniço em Maputo

3.2. Objectivo Específicos

- Determinar a prevalência de hantavírus em pacientes febris agudos atendido no Centro de Saúde Polana Caniço em Maputo, durante o período de 2012 a 2014;
- Determinar os factores demográficos e socioeconómicos associados à infecção pelo hantavírus;
- Estabelecer algoritmo laboratorial no diagnóstico de hantavírus;

4. METODOLOGIA DO ESTUDO

4.1. Desenho de estudo

Trata-se de um estudo transversal cuja população de estudo foi constituída por pacientes com quadro febril agudo, atendidos diariamente no ambulatório do Centro de Saúde Polana Caniço, na Cidade de Maputo. Cada paciente, voluntariamente convidado para participar no estudo, assinou o formulário de consentimento livre esclarecido, após ter sido devidamente informado sobre os objectivos e procedimentos do estudo. A todos os pacientes que aceitaram participar no estudo foi aplicado um questionário para obtenção de informação clínica-demográfica e de exposição além da colheita de uma amostra de sangue (Anexo 1).

Cada participante foi orientado a regressar para a unidade sanitária duas semanas após o recrutamento para acolheita de sangue durante o período de convalescença. Uma terceira visita foi solicitada a cada paciente, duas semanas após a segunda visita para entrega dos resultados da testagem laboratorial. O manuseio clínico de cada participante foi realizado de acordo com as directrizes de manuseio de síndrome febril vigentes no MISAU.

A equipe do estudo, além do pessoal clínico, foi composta por três técnicos de medicina geral e um técnico de laboratório em cada local de estudo. Os clínicos foram responsáveis por solicitar o consentimento para a participação e por aplicar o questionário e o técnico de laboratório foi responsável pela colheita de sangue.

4.2. Local do estudo

O estudo foi realizado no Centro de Saúde Polana Caniço, uma unidade sanitária de área de saúde de Mavalane na Cidade de Maputo, que cobre cerca de 55.000 habitantes e faz atendimento de ambulatório geral e de urgência. Nesta unidade sanitária, são diariamente atendidos pacientes de todos os sexos, idades, de segunda à sexta-feira.

O centro de saúde conta com uma grande população dos bairros Polana Caniço A e B, localizada em área suburbana da cidade de Maputo, Moçambique (Figura 1.6). Os pacientes foram recrutados entre Fevereiro de 2012 e Outubro de 2014. As famílias nesses bairros vivem em casa de construção precária com elevado número de agregado familiar, com saneamento deficiente, o clima em geral é o tropical húmido. O nível de educação é baixo e a principal fonte de renda é o mercado informal.

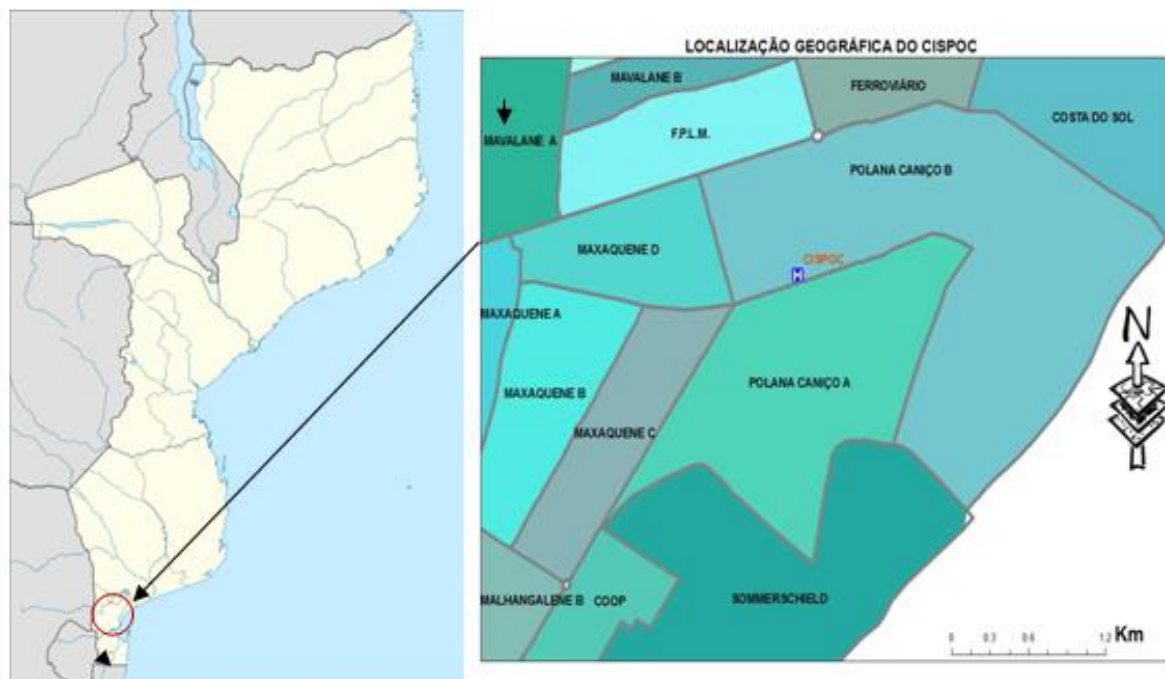


Figura 1.6: Representação geográfica da área de estudo

4.3. Critério de inclusão e exclusão

4.3.1. Critério de inclusão

- Idade: igual ou maior do que 5 anos
- Temperatura axilar igual ou superior a 37.6°C na hora do exame físico,
- Paciente que refere um episódio de febre há não mais de 5 dias;
- Paciente residente na área do Centro de Saúde Polana Caniço;
- Karnofsky maior ou igual a 70%.

4.3.2. Critério de exclusão

- Gravidez;
- Incapacidade de consentir ou doença psiquiátrica;
- Tuberculose activa;
- História de antibioterapia nos últimos 7 dias;

5. TAMANHO DA AMOSTRA E DURAÇÃO DO ESTUDO

Foram inscrito 500 pacientes febris no período de Fevereiro 2012 á Outubro2014, dos quais 200 retornaram a visita de convalescença e os restantes 300 foram perdidos de seguimento

Para alcançar este tamanho amostral foram recrutados consecutivamente, por dia, primeiros oito indivíduos elegíveis

Foi utilizada a seguinte fórmula para determinar o tamanho amostral:

Onde: n = Tamanho da amostra

$$n = \frac{Z^2 P(1 - P)}{d^2}$$

Z = Estatística para o nível de confiança.

P = Prevalência esperada.

d = Erro máximo de estimativa

5.1. Colheita e transporte de amostras

Amostras de sangue venoso, em um volume de 10 ml, foram colhidas durante a fase inicial da febre, no dia da primeira visita, utilizando tubos com K₃EDTA (5 mL) e sem anticoagulante (5 mL) usando as precauções padrões de biossegurança. Uma segunda amostra de 5 mL de sangue venoso em tubo com K₃EDTA foi colhida duas semanas depois, durante a visita de convalescença.

No laboratório, o sangue foi centrifugado para a separação de soro e plasma e depois congelado a -80°C. Posteriormente, as amostras foram transportadas em cadeia de frio entre 2-8°C, para o laboratório de referência de Virologia do INS, Maputo e posteriormente para o Laboratório de Hantavirozes e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, onde foram submetidas à análise laboratorial para pesquisa de infecção por hantavírus.

5.2. O diagnóstico serológico

As amostras do soro foram submetidas a teste sorológico seguindo os procedimentos preconizados no Laboratório de Hantavirozes e Rickettsioses para pesquisa de anticorpos da classe IgM com a utilização da proteína N recombinante do vírus Andes, fornecido pelo ANLIS/Argentina seguindo o protocolo fornecido por Padula e colaboradores (31)

Para a realização de testes, placas de 96 poços foram sensibilizadas com proteínas recombinante do nucleocapsídeo do hantavírus ANDES na metade superior (linhas A, B, C, D) e com extracto de *Escherichia coli* na metade inferior (linhas E, F, G, e H) diluídos em solução tampão carbonato-bicarbonato na concentração de 0,2 µg/µL, durante incubação por uma noite (“*overnight*”) a 4°C. Em seguida, após lavar a placa por 5 vezes com PBS pH 7.4 acrescido de Tween (PBS-T) 1X a 0,05% foi adicionada solução de bloqueio (leite em pó desnatado a 10% em PBS- T)

Após incubação da placa a 37 °C por duas horas e subsequente etapa de lavagem, as amostras de soro positivo e negativo utilizados como controle do teste e as amostras em teste foram adicionadas na diluição de 1/400 em solução de bloqueio (5µl da amostra/495 µl da solução de bloqueio). Após a nova incubação a 37°C por uma hora e etapa de lavagem por 6 vezes, anticorpos secundários anti-IgM humano conjugado com peroxidase foram utilizados como conjugado na diluição de 1/2000

em solução de bloqueio. Após incubar e lavar novamente a placa, o substrato cromogênico 2,2 azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6sulfonato) ABTS (KPL, USA) foi adicionado e a placa então foi incubada por 20min a 37°C. A absorbância foi mensurada a 405nm em espectrofotômetro.

A diluição do soro foi considerada positiva quando a densidade óptica (DO) superior 0,3. A DO final de cada diluição do soro foi calculada como diferença entre o valor da DO mensurada nos poços sensibilizados com a proteína ANDV-N e aqueles sensibilizados com antígenos inespecífico (*E. coli*), um título \geq 1:400 foi considerado positivo.

Nas amostras soroactivas IgM anti-hantavírus, adicionalmente foi realizada pesquisa de anticorpos da classe IgG, utilizando o mesmo protocolo, excepto pelo fato de que anticorpos secundários anti-IgG humano conjugado com peroxidase foram utilizados como conjugado.

5.3. Técnica molecular

Extracção de RNA

As amostras de soro de pacientes reativas foram submetidas à extracção do RNA viral no Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses por meio do kit comercial QIAamp®Viral RNA mini Kit (Qiagen), respectivamente, seguindo o protocolo do fabricante (Anexo 2)

RT-PCR

A partir do RNA total extraído foram realizadas a síntese do cDNA e amplificação com utilização do Mini Kit *Super Script III™ One-Step RT-PCR System* com *Platinum®TaqDNA Polymerase* (Invitrogen) e de *primers* específicos para genoma viral (14,29)

Na PCR, tubos de 0,5 mL foram utilizados para preparar a solução de trabalho, que continha os primers (0,5 µL do *primer forward* e 0,5 µL do *primer reverse*), água *nuclease-free* (8,8µL), *Super Script™III RT* com Taq DNA polimerase (0,5 µL), tampão de 2x *Mix* (12,5 µL), e cloreto de magnésio 50mM (0,2 µL), com um volume total de

23 µL. Esta mistura foi então distribuída em microtubos para PCR (0,2 mL) com acréscimo de 2 µL de RNA da amostra, totalizando um volume final de 25 µL. Os tubos foram subsequentemente alocados em um termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Bio systems).

Semi-Nested PCR (PCR 2)

Na segunda PCR, tubos de 0,5 mL foram utilizados para preparar a solução de trabalho, que continha os primers (0,5 µL do *primer forward* e 0,5 µL do *primer reverse*), água *nuclease-free* (15 µL), dNTP (0,25µL), enzima *Ampli Taq Gold®* DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific) (0,25µL), tampão de 10xMix (2,5 µL), e magnésio 50mM (4 µL), com um volume total de 23 µL. Esta mistura foi então distribuída em micro tubos para PCR (0,2 mL) com acréscimo de 2 µL do produto da primeira PCR da amostra, com um volume final de 25 µL. Os tubos foram subsequentemente analisados em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Bios ystems).

Análise dos produtos da reação de amplificação em eletroforese em gel de agarose

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

5.4. Análise de dados

Os dados foram introduzidos e armazenado no Microsoft Office Excel 2010. A análise estatística foi efetuada usando o Software STATA versão 13.0. Foi realizado o test Qui-quadrado e de Fisher, o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5.4.1. Considerações éticas

Este estudo faz parte de um projecto maior sobre Etiologia do Síndrome Febril Agudo em Pacientes Atendidos no Centro de Saúde da Polana Caniço em Maputo (SIFA) que foi aprovado pelo Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS com Ref nº 00002657), e os voluntários assinaram Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), que se encontra no anexo 2.

6. RESULTADOS

Durante o período de estudo, foram incluídos um total de 500 doentes febris, dos quais 200 retornaram para a visita de convalescença; os outros 300 pacientes não regressaram e o seguimento não foi possível (figura 6.1). Destes 200 pacientes que retornaram à convalescença, 99 (49,5%) pacientes eram do sexo masculino com idade média de 33 anos (IQR: 24-47), variando entre 6 e 78 anos.

Quatro dos 200 participantes apresentaram anticorpos IgM anti-hantavírus, o que corresponde a uma frequência de detecção de Hantavirus de 2,0%. Todas as amostras convalescentes de pacientes IgM positivos também foram reactivas para anti-hantavírus IgG, mas quando submetidas à análise molecular (PCR) foram negativa.

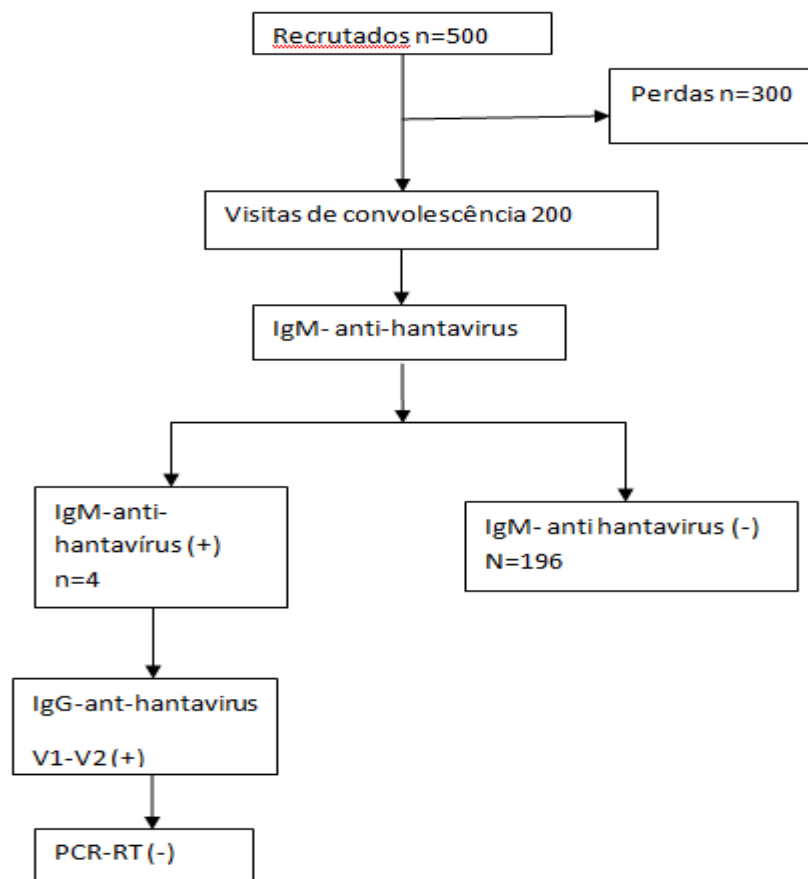


Figura 1.7: Fluxograma de recrutamento dos participantes do estudo e diagnóstico laboratorial

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes IgM positivos e negativos em termos de suas características clínicas e demográficas. Entretanto, a frequência de contacto com roedor foi maior nos pacientes IgM positivos, mas esta diferença não atingiu significância estatística ($p=0,061$) (tabela 6.1).

Tabela 3.3: Características sócio-demográficas dos pacientes atendidos em ambulatório no centro de saúde de Polana Caniço no ano 2012-2014

Características	IgM- Negativo	IgM- Positivo	<i>p-value</i>
Idade			
Mediana (IQR)	33 (24-47)	24(16-34)	0,162
Sexo			
Masculino	99 (50,8%)	2 (50,0%)	0,976
Feminino	96 (49,2%)	2 (50,0%)	
Nível académico			
Nenhum	26 (13,3%)	-	
Primário	102 (52%)	1(25,0%)	0,762
Secundario	66 (33,7%)	3 (75,0%)	
Universitário	2 (1,0%)	-	
Previsão de contacto com roedores			
Sim	30 (15,3)	2 (50,0%)	0,061
Não	166(84,7%)	2 (50,0%)	
Manifestações clínicas			
Febre	188 (95,9%)	2 (50,0%)	0,000
Cefaleia	108 (55,1%)	3(75,0%)	0,428
Mialgia	14 (7,1%)	1 (25,0%)	0,179
Artralgia	32 (16,3%)	1 (25,0%)	0,644

Tosse	13 (7,1%)	0 (0,0%)	0,582
Arrepios	37 (18,9%)	1 (25,0%)	0,757
Náuseas	1 (0,5%)	0 (0,0%)	0,886
Vómitos	11(5,6%)	0 (0,0%)	0,626
Diarreia	2 (1,1%)	0 (0,0%)	0,834
Dor abdominal	4 (2,0%)	0 (0,0%)	0,773

Test q quadrado, $p < 0,05$

De notar que, entre os doentes IgM positivos, apenas um paciente apresentou resultado positivo para a malária, no entanto todos foram tratados com fármacos anti-maláricos (Tabela 6.2).

Tabela 4.4: Resultado laboratorial dos quatro pacientes com evidência sorológica de infecção por hantavírus que foram atendidos em ambulatório no centro de saúde da Polana Caniço (2012-2014)

#	Data de início de sintomas	Data da colheita da amostra	# Dias	Sorocon versão de Ac IgG hant	IgM hant	PCR-RT hant	Esfregaço sanguíneo (Malária)	Trat anti-malária
1	Agos 22 2014	Agos 23 2014	1	Reactivo	Reactivo	-	-	sim
2	Out 16 2014	Out 17 2014	2	Reactivo	Reactivo	-	-	sim
3	Fev 6 2012	Fev 7 2012	1	Reactivo	Reactivo	-	-	sim
4	Mar 3 2014	Mar 4 2014	<1	Reactivo	Reactivo	-	+	sim

Quanto aos resultados dos testes laboratoriais inespecíficos (Tabela 6.3), os doentes IgM positivos apresentaram valores médios significativamente mais elevados de creatinina (mediana: 0,69 mg / dL versus 0,65 mg / dL, $p = 0,003$) e ALT (mediana: 76,0 UI / L versus 31,0 UI / L. $p = 0,003$) valores medianos significativamente mais

baixos de plaquetas (mediana: 119,103 células / mm³ versus 207,103 / mm³ p = 0,001). Foi observado que houve também uma tendência de valores médios mais elevados de AST entre os pacientes IgM positivos, embora o valor p não tenha alcançado significância estatística (mediana: 55,0 UI / L versus 32,5 UI / L, p = 0,058).

Tabela 5.5: Características Laboratoriais dos pacientes atendidos no ambulatório no centro de saúde de Polana Caniço (2012-2014)

Características	IgM negativo (n=196)	IgM positivo (n=4)	p-value
Contagem de leucócitos totais, cell/mm³			
Media	7.9	7.2	0,721
IQR	6-0-10.0	5.6-9.4	
Hemoglobina, gr/dL			
Media	10.0	10.1	0,702
IQR	8.0-11.0	9.0-10.6	
Plaquetas, cells/mm³			
Media	207	119	0,001
IQR	160-240	117-123	
Ureia,mmol/l			
Media	23.8	24.5	0,954
IQR	22.0-27.5	20.0-31.0	
Creatinina, mg/dL			
Media	0,65	0.69	0,003

IQR	0.45-0.71	0.56-1.07	
ALT, UI/L			
Media	31.0	76.0	0,003
IQR	21.0-47.0	66.5-76.5	
AST, UI/L			
Media	32.5	55.0	0,058
IQR	23.0-46.0	42.0-73.5	

7. DISCUSSÃO

Considerando o número crescente de novos hantavírus identificados no continente africano nos últimos dez anos, não somente em roedores, mas também em quirópteros como insectívoros, torna-se urgente esclarecer se estes hantavírus estão associados ou não a casos de doença em humanos em África, pois até o momento ainda não foi isolado hantavírus associado à doença no continente. Assim, este estudo foi conduzido com a intenção de investigar a ocorrência de hantavírus em pacientes febris agudo no subúrbio da cidade de Maputo.

A análise das amostras de soro de 200 pacientes febris residentes na Cidade de Maputo possibilitou a identificação de anticorpos IgM contra hantavírus de 2,0% desta amostra. Esta frequência foi menor do que a observada em um estudo realizado em Guiné por *Klempae* e colaboradores (2010), no qual foi possível verificar uma seroprevalência de 4.4% de anticorpos específicos para hantavírus em doentes com febre de origem desconhecida. Semelhante ao presente estudo, *Klempae* e colaboradores (2010) também identificaram pacientes reactivos tanto para anticorpos da classe IgG quanto IgM, sugerindo tratar-se de infecção por hantavírus, embora o genoma viral não tenha sido encontrado e conseqüentemente os casos foram confirmados apenas com base sorológica (3). Desta forma, este estudo é inédito em Moçambique e por outro lado expande a limitada evidência sobre hantavírus na África

Subsaariana (7), aumentando o número de países que reportaram evidências sorológicas deste vírus na região (7,14).

A infecção humana por hantavírus tem sido muito negligenciada na África subsaariana, onde muitos poucos estudos na população humana foram realizados, até a presente data (7). Os hantavírus representam um grupo importante de vírus emergentes e ou re-emergentes, cuja associação com casos de doença em humanos têm sido restrita a Eurásia e Américas. Somente em 2006 o primeiro hantavírus africano, o SANGV, ainda não associado com nenhum caso de doença humana, foi identificado em roedores em África (14). Assim, apesar da evidência de alguns poucos casos de HFRS relatados até agora na África Subsariana (14), devido à falta de identificação molecular do agente viral nas amostras de casos febris sororreativos (IgM e IgG), ainda não é possível afirmar irrefutavelmente que casos de doença associados aos hantavírus ocorram no continente africano. No entanto, é pertinente registrar o notável progresso que tem sido alcançado no campo da descoberta de hantavírus, no qual os resultados obtidos nos estudos soro epidemiológicos indicam que infecções por hantavírus podem ser um problema médico negligenciado e totalmente desconsiderado principalmente em áreas endêmicas de malária e febre hemorrágicas virais (3).

Em nosso estudo, pacientes com anticorpos IgM anti-hantavírus apresentaram manifestações clínicas e laboratoriais sugestivas de doença febril leve por hantavírus, com discreta hemorragia, trombocitopenia, níveis mais elevados de creatinina e enzimas hepáticas. No entanto, é pertinente considerar que essas alterações clínicas e laboratoriais também podem ocorrer em muitas outras doenças infecciosas ou não infecciosas já que não são específicas para a infecção pelo hantavírus. Não obstante o facto de que estes resultados precisam ser interpretados com alguma cautela por conta da inespecificidade clínica, é preciso também registrar que o modelo proposto em nosso estudo apresenta limitações, já que todos pacientes incluídos no estudo foram recrutados em um centro de saúde que atende apenas pacientes ambulatoriais com manifestações clínicas brandas e, assim, desta forma, neste estudo não foram analisados os casos graves. Ainda neste contexto, como os anticorpos da classe IgM podem persistir vários meses pós a infecção pelo hantavírus (1), a probabilidade de

que esses pacientes apresentem uma exposição anterior, mas não recente, ao hantavírus, não pode ser descartada.

Como observado previamente, a frequência de anticorpos anti-hantavírus encontrados no nosso estudo foi semelhante à encontrada em vários estudos realizados na região (7,14). Em adição, também em concordância com todos outros estudos realizados na região subsaariana, em nossa pesquisa, nenhuma amostra sororreativa foi PCR-positiva. A não detecção do RNA viral nas amostras dos pacientes tanto da presente pesquisa quanto dos demais estudos no continente africano pode ser explicada pelo curto período de viremia e pela perda do RNA viral nas amostras submetidas a repetidos ciclos de congelamento-descongelamento antes do teste.

Considerando que pacientes sororreativos para hantavírus residiam em área urbana e que o contacto com roedores foi ligeiramente maior em pacientes com resultados positivo para IgM quando comparados com pacientes hantavírus soro negativos é possível concluir, em consonância com estudos anteriores, que a exposição a roedores representa um factor de risco em locais urbanos, principalmente nas regiões peri-urbanas devido à expansão das cidades para áreas rurais (17,31).

Muitas lacunas ainda precisam ser preenchidas no campo das hantaviroses no continente africano. Assim, a sobreposição da apresentação clínica das hantaviroses com muitas outras doenças febris na África subsaariana associada com a falta de dados epidemiológicos e a falta de capacidade laboratorial para a confirmação etiológica são os principais factores para o menor nível de consciência e suspeita de hantavírus nesta região (1,8,12).

É preciso registar que um dos quatro pacientes IgM hantavirus positivos apresentou evidência de coinfeção por malária. Embora resultado semelhante tenha sido observado por Terças em sua tese de doutorado (2016), relatos de infecções concomitantes com malária têm sido relatados com outros agravos como dengue, HIV, tuberculoses, helmintoses, infecções bacterianas, e infecção simultânea entre malária, dengue e chikungunya, fato que reforça a possibilidade de coinfeção (33,34).

Como todos os pacientes foram tratados com anti-malárico, este estudo também aponta para o diagnóstico frequente e tratamento de malária, em pacientes com outras causas de doença febril.

Por fim, embora neste estudo não tenha sido possível identificar material genético viral, os nossos dados combinados com os relatos recentes de evidência sorológica de infecção por hantavírus em humanos e a identificação de hantavírus em reservatórios silvestres na África subsaariana sugerem que os hantavírus representam um grave e ignorado problema de saúde cujas pesquisas precisam ser estimuladas, em especial, os estudos sistemáticos de casos febris associados com manifestações renais e respiratórias.

8. CONCLUSÕES

- A identificação, com base no teste sorológico, pela primeira vez em Moçambique, de casos febris agudos sororreativos para hantavírus corrobora a hipótese da presença de hantavirose no continente africano.
- Os pacientes sororreativos IgM e IgG para hantavírus apresentaram características semelhantes ao descrito na literatura.
- A evidência de coinfeção de malária com hantavírus reforça a necessidade de se realizar o diagnóstico diferencial, em especial nos pacientes com história de contato com roedor.
- Os dados do estudo mostram pela primeira vez, que os seres humanos estão expostos ao hantavírus em Moçambique, sugerindo que os hantavírus ocorrem insuspeitados e todos os casos podem ser diagnosticados como malária ou outras infecções comuns que ocorrem em Moçambique.

9. PERSPECTIVA FUTURAS

- Divulgar informações sobre hantavirose aos diversos sectores, especialmente aos profissionais de saúde, a partir de folhetos explicativos e palestras.
- Realizar pesquisas com base na análise sorológica e molecular em população humana com quadro febril associado com manifestação pulmonar e renal em áreas com condições eco-epidemiológicas para a presença dos hantavírus.
- Realizar estudos sobre a distribuição geográfica das espécies e géneros de roedores potencialmente transmissores de hantavírus.
- Investigar a presença de infecção por hantavírus em roedores silvestres capturados em áreas com casos humanos confirmados por teste sorológico ou molecular.
- Caracterizar molecularmente os hantavírus identificados tanto em amostras humanas quanto de animais silvestres.
- Criar programas de treinamento visando à formação de equipas de campo para trabalho com roedores e humanos.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Figueiredo LTM, Forster AC, Fulhorst C, Rodrigues EMS, Koster F, Campos GM, et al. Contribuição ao conhecimento sobre a *hantavirose* no Brasil. Inf Epidemiológico SUS. 2000;9(3):167–178.
2. Lamas C da C, Oliveira R de, Silva RG da, Vicente LHB, Almeida EB de, Lemos ERS de, et al. *Hantavirus* infection in HIV positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil: a seroprevalence study. 2013 em: http://www.arca.fiocruz.br/bitstream/iciict/11734/2/cristinae_lamas_et al_IOC_2013.pdf
3. Ferreira MS. *Hantaviruses*. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(1):81–96.
4. Rasmuson J, Andersson C, Norrman E, Haney M, Evander M, Ahlm C. Time to revise the paradigm of *hantavirus* syndromes? *Hantavirus* pulmonary syndrome caused by European *hantavirus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Maio de 2011;30(5):685–90.
5. Pincelli MP, Barbas CSV, Carvalho CRR de, Souza LTM de, Figueiredo LTM. *Hantavirus* pulmonary and cardiovascular syndrome. J Pneumol. 2003;29(5):309–323.
6. WHO _ *Hantavirus* diseases.htm.
7. Witkowski PT, Klempa B, Ithete NL, Auste B, Mfuno JKE, Hoveka J, et al. *Hantaviruses* in Africa. Virus Res. Julho de 2014;187:34–42.
8. Hujakka H, Koistinen V, Kuronen I, Eerikäinen P, Parviainen M, Lundkvist Å, et al. Diagnostic rapid tests for acute *hantavirus* infections: specific tests for *Hantaan*, *Dobrava* and *Puumala* viruses versus a *hantavirus* combination test. J Virol Methods. Março de 2003;108(1):117–22.
9. Terças ACP. Instituto de Saúde Coletiva [Internet]. Universidade Federal de Mato Grosso; 2011 de Oliveira R, Guterres A, Fernandes J, D'Andrea P, Bonvicino C, de Lemos E. *Hantavirus Reservoirs*: Current Status with an Emphasis on Data from Brazil. Viruses. 2014;6(5):1929–73.
11. Galeno H, Mora J, Villagra E, Fernandez J, Hernandez J, Mertz GJ, et al. First human isolate of *Hantavirus* (*Andes virus*) in the Americas. Emerg Infect Dis. 2002;8(7):657–661.

12. Plyusnin A, Sironen T. Evolution of *hantaviruses*: Co-speciation with reservoir hosts for more than 100MYR. *Virus Res.* 2014;187:22–6.
13. Figueiredo LTM. Vírus brasileiros da família Bunyaviridae. *Med Ribeirao Preto Online.* 1998;32(2):154–158.
14. Klempa B, Witkowski PT, Popugaeva E, Auste B, Koivogui L, Fichet-Calvet E, et al. *Sangassou* Virus, the First *Hantavirus* Isolate from Africa, Displays Genetic and Functional Properties Distinct from Those of Other Murinae-Associated Hantaviruses. *J Virol.* 2012;86(7):3819–27.
15. Schmidt S, Saxenhofer M, Drewes S, Schlegel M, Wanka KM, Frank R, et al. High genetic structuring of Tula *hantavirus*. *Arch Virol.* 2016; 161(5):1135–49.
16. Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses - Google Livros.htm.
17. Meissner JD, Rowe JE, Borucki MK, Jeor SCS. Complete nucleotide sequence of a Chilean *hantavirus*. *Virus Res.* 2002;89(1):131–143.
18. Medina RA, Torres-Perez F, Galeno H, Navarrete M, Vial PA, Palma RE, et al. Ecology, Genetic Diversity, and Phylogeographic Structure of Andes Virus in Humans and Rodents in Chile. *J Virol.* 2009;83(6):2446–59.
19. Vadell MV, Erize FG, Gómez Villafañe IE. Evaluation of habitat requirements of small rodents and effectiveness of an ecologically-based management in a *hantavirus*-endemic natural protected area in Argentina. *Integr Zool* 2016
20. Pensiero MN, Hay J. The *Hantaan* virus M-segment glycoproteins G1 and G2 can be expressed independently. *J Virol.* 1992;66(4):1907–1914.
21. López N, Padula P, Rossi C, Miguel S, Edelstein A, Ramírez E, et al. Genetic characterization and phylogeny of Andes virus and variants from Argentina and Chile. *Virus Res.* 1997;50(1):77–84.
22. Ferreira MS. *Hantaviruses*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(1):81–96.

23. Shin OS, Song GS, Kumar M, Yanagihara R, Lee H-W, Song J-W. Hantaviruses Induce Antiviral and Pro-Inflammatory Innate Immune Responses in Astrocytic Cells and the Brain. *Viral Immunol.* 2014;27(6):256–66.
24. Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses - Google Livros.htm.
25. Peters FB, Roth PRDO, Christoff AU. Primeiro registro documentado de *Holochilus brasiliensis* (Desmarest, 1819) e *Calomys laucha* (G. Fischer, 1814) no estado de Santa Catarina, sul do Brasil. *Biotemas* [Internet]. 2013
26. Feng AYT, Himsworth CG. The secret life of the city rat: a review of the ecology of urban Norway and black rats (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*). *Urban Ecosyst.* 2014;17(1):149–62.
27. Weigler BJ, Ksiazek TG, Vandenberg JG, Levin M, Sullivan WT. Serological Evidence for Zoonotic *Hantaviruses* in North Carolina Rodents. *J Wildl Dis.* 1996;32(2):354–7.
28. Witmer GW, Moulton RS. Deer Mice (*Peromyscus spp.*) biology, damage and management: a review. 2012
29. Lamas C da C, Oliveira R de, Silva RG da, Vicente LHB, Almeida EB de, Lemos ERS de, et al. *Hantavirus* infection in HIV positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil: a seroprevalence study. 2013
http://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/11734/2/criastinae_lamas_et_al_IOC_2013.pdf
30. Alves Morais F, Pereira A, Santo Pietro Pereira A, Lazaro Moreli M, Marcelo Aranha Camargo L, Schiavo Nardi M, et al. Serological Survey of Hantavirus in Inhabitants from Tropical and Subtropical Areas of Brazil. *Adv Virol.* 2016;2016:1–6.
31. Muñoz-Zanzi C, Saavedra F, Otth C, Domancich L, Hott M, Padula P. Serological Evidence of *Hantavirus* Infection in Apparently Healthy People from Rural and Slum Communities in Southern Chile. *Viruses.* 17 de 2015;7(4):2006–13.

32. Figueiredo LTM, Forster AC, Fulhorst C, Rodrigues EMS, Koster F, Campos GM, et al. Contribuição ao conhecimento sobre a *hantavirose* no Brasil. *Inf Epidemiológico SUS*. 2000;9(3):167–178.
33. Raut CG, Rao NM, Sinha DP, Hanumaiah H, Manjunatha MJ. *Chikungunya, Dengue, and Malaria* Co-Infection after Travel to Nigeria, India. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(5):907–9.
34. Moses A, Atting I, Inyang O. Evidence of Overlapping Infections of *Dengue, Malaria* and Typhoid in Febrile Patients Attending a Tertiary Health Facility in Uyo, South-South Nigeria. *Br J Med Med Res*.2016;17(3):1–9.