UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO SOBRE A
HANTAVIROSE NA REGIÃO DE RIBEIRÃO
PRETO, SP

Gelse Mazzoni Campos

Trabalho apresentado ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Ribeirão Preto, como quesito para obtenção do grau de Mestre em Clínica Médica

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Ribeirão Preto

2002

DEDICATÓRIA

A todos os profissionais de saúde envolvidos com o atendimento e difícil diagnóstico das moléstias emergentes e re-emergentes.

Ao meu pai, meu grande mestre e minha mãe, a grande guerreira, pelo exemplo de força e trabalho durante toda uma vida.

Aos meus filhos queridos: Daniela, Miguel, Otávio, Davi e Adelmo e enteados Heloisa e Guilherme, pela participação direta ou indireta e pela compreensão da ausência materna, paciência nos períodos difíceis e incentivo restaurador.

Ao meu marido Luiz Roberto, pelo total envolvimento, carinho e dedicação, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr Luiz Tadeu, pela paciência com os meus erros, pela dedicação e transmissão de conhecimentos em todas as horas e pela confiança em mim depositada para realizar trabalho de tamanha responsabilidade.

À querida Soraya, efetiva companheira, seja no trabalho de campo, como no laboratório, além do caráter pessoal de apoio e incentivo sempre.

A todos os colegas do Laboratório de Virologia: Veridiana, Flávia, Marcos, Daniela, Victor Hugo, Egnair, Roberta, Mário, Marcia, Viviane e Regina, pelo apoio e interesse dedicado em todas as horas.

À equipe de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto, em especial a enfermeira Cila, que muito nos auxiliaram no levantamento dos dados dos pacientes de Ribeirão Preto e região e no processo de alerta junto aos profissionais de saúde.

A toda a equipe de saúde de Jardinópolis, em especial Dr. Clodoaldo, Mona Lisa, Aparecida, Lea, Silvana e todos os funcionários da Secretaria Municipal de Saúde de Jardinópolis que auxiliaram na execução do Inquérito.

Aos professores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto que, de maneira direta e indireta, auxiliaram no planejamento e execução deste trabalho.

À querida amiga Elisabeth Brayn, pelo interesse, apoio e exaustivo trabalho de revisão e pelas valiosas sugestões.

À querida amiga Vera Hanna, pelo incentivo além da revisão gramatical e ortográfica.

Aos queridos Júlio e Murilo pela correção dos textos em inglês

A todos os meus amigos queridos, pelo incentivo, apoio e paciência, até nas horas de desânimo.

A todos os colaboradores anônimos, presentes e ausentes, que de alguma forma nos auxiliaram na execução deste projeto.

Resumo

As hantavirose são zoonoses de roedores silvestres que causam doenças humanas graves: febre hemorrágica com síndrome renal na Ásia e Europa, com letalidade de 10 a 12% e no continente americano causam a Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por *Hantavirus* (SPCVH), letalidade de 59%.

Os *Hantavirus* (família *Bunyaviridae*) são vírus envelopados que medem aproximadamente 120 nm, possuem RNA de fita simples e polaridade negativa, dividida em 3 segmentos (L, M e S) que se replicam no citoplasma. A infecção humana relaciona-se à inalação de aerossóis de excretas de roedores infectados com *Hantavirus*, embora existam relatos de transmissão interpessoal na América do Sul. No Estado de São Paulo, os roedores infectados mais encontrados foram o “rato do rabo peludo” (*Bolomys lasiurus*), o “rato da mata” (*Akodon cursor*) e o “ratinho do arroz” (*Oligoryzomys negrips*).

Desde os 3 primeiros casos de hantavirose descritos no Brasil (1993) com indivíduos moradores da área rural de Juquitiba, SP, evidenciando o primeiro surto conhecido de SPCVH, mais de uma centena de casos da SPCVH foram notificados, causando 60 óbitos (letalidade de 46%).

Na região de Ribeirão Preto, ocorreram quatorze casos de SPCVH de 1998 a 2001, com letalidade de 64,2%, o que motivou este trabalho.

Um primeiro objetivo deste trabalho foi estudar aspectos clínicos e epidemiológicos dos casos de hantavirose ocorridos na região de Ribeirão Preto, de 1998 a 2001, para conhecer o comportamento das hantavirose nesta região. Analisando e acompanhando prontuários de 14 pacientes com SPCVH, observou-se febre (100% dos casos), estertores pulmonares, dispnéia e tosse (64,2%), taquicardia acompanhada de hipotensão (64,2%), cefaléia e sintomas digestivos (57%), adinamia e indisposição geral (50%), fenômenos hemorrágicos (28,5%), mialgia (21,4%) e convulsão (7,5%). No perfil laboratorial, a plaquetopenia $<130000/\text{mm}^3$ (100%), hematócrito $>55\%$, (78,6%); leucocitose $>15000/\text{mm}^3$ (64,2%), neutrofilia $>7000/\text{mm}^3$ e bastonetes $>600\text{ cels}/\text{mm}^3$ (64,2%), creatinina sérica $>1,5\text{mg}/100\text{ml}$ (63,6%) e $\text{PO}_2 <70\text{ mmHg}$ (54,5%). O diagnóstico laboratorial das hantavirose foi feito por ELISA para IgM e IgG anti Sin Nombre após a alta.

Houve diferença significativa entre casos fatais e sobreviventes, quanto à época de suspeita diagnóstica de hantavirose ($p=0,0152$) e quanto ao uso de hidratação parenteral ($p=0,0152$): nos sobreviventes, a suspeita diagnóstica de SPCVH foi feita entre o 1º e o 2º dia de internação e, nos

casos fatais, a suspeita foi feita apenas na necropsia. Existe uma correlação significativa entre o volume de infusão endovenosa de líquidos ≥ 2500 ml, nas primeiras 24h de tratamento, e a evolução dos casos para o óbito. A oxigenação precoce, ventilação mecânica, assim como o uso de aminas vasoativas e o de corticosteróides não tiveram associação com sobrevida e a presença de choque não teve associação com óbito.

O segundo objetivo foi estudar a prevalência de anticorpos para *Hantavirus* na população de Jardinópolis, na região de Ribeirão Preto, SP. Em estudo prévio entre cidades da região de Ribeirão Preto, obteve-se maior índice de prevalência sorológica (4,5%) para *Hantavirus* naquele município.

Através de coleta aleatória em parte da área rural e em toda a área urbana, obtivemos 818 amostras de sangue de moradores entre 15 e 70 anos, por digitopuntura em papel de filtro, dos quais coletamos dados relevantes como idade, sexo, cor, procedência, atividade profissional, endereço, telefone; moléstia atual, medicamentos em uso, pneumonia grave pregressa, tipo de moradia, número de moradores na casa, esgoto, coleta de lixo, celeiro, contato com roedores. Essas amostras foram processadas nas diluições 1/50, 1/100, 1/400 e 1/1600 e submetidas ao ELISA indireto para detecção de IgG para *Hantavirus* Andes. Os resultados foram analisados pelo teste de Fisher e teste do Qui-quadrado, utilizando o programa InStat 3.0 (GraphPad Software Inc, USA) e para α de 5%, com intervalo de confiança de 95%. A positividade geral foi de 14,3% com ELISA à diluição 1/50, na zona urbana foi de 15,3% e na zona rural de 6,5%, demonstrando alta representatividade para a população do município de Jardinópolis.

Entre moradores de zona urbana e rural, a positividade para *Hantavirus* foi significativamente maior para os moradores urbanos ($p= 0,0183$). E entre as diferentes faixas etárias com a das restantes, observou-se diminuição significativa para a faixa etária de 21 a 30 anos ($p= 0,0117$) e aumentada para a de 31 a 40 anos ($p= 0,0036$). Não houve diferença significativa de positividade para *Hantavirus* observada nos homens e nas mulheres ($p= 0,0892$), nem para indivíduos com atividade profissional urbana e rural ($p=0,8799$), nem com os indivíduos que referiram pneumonia grave ($p= 0,6096$) e da mesma forma nos indivíduos que declararam contato com roedores ($p= 0,4842$). Assim como não houve associação entre títulos de 100 e 400 para as mesmas características analisadas.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. OS HANTAVIRUS	8
1.2. REPLICAÇÃO DOS <i>HANTAVIRUS</i>	9
1.3. HANTAVIROSES NO BRASIL	10
1.4. EPIDEMIOLOGIA DA HANTAVIROSE	11
1.5. PATOGÊNESE DA SPCVH	13
1.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS HANTAVIROSES	15
1.7. A REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO E O MUNICÍPIO DE JARDINÓPOLIS	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. ESTUDO DE SÉRIE DE CASOS COM SPCVH	19
3.1.1. AVALIAÇÃO TARDIA DE PACIENTES QUE TIVERAM SPCVH	21
3.2. INQUÉRITO SOROLÓGICO PARA <i>HANTAVIRUS</i> EM JARDINÓPOLIS	21
3.2.1. PLANEJAMENTO	21
3.2.2. EXECUÇÃO DO INQUÉRITO	22
3.2.3. PREPARO DAS AMOSTRAS DE SANGUE DO INQUÉRITO SOROLÓGICO	23
3.2.4. ELISA PARA <i>HANTAVIRUS</i>	24
3.2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	28
4. RESULTADOS	29
4.1. ESTUDO DE SÉRIE DE CASOS COM SPCVH	29
4.1.1. QUADRO CLÍNICO DA SPCVH	29
4.1.2 QUADRO LABORATORIAL DA SPCVH	29
4.1.3. CRONOLOGIA DOS SINAIS, SINTOMAS E ALTERAÇÕES LABORATORIAIS NOS PACIENTES COM SPCVH	30
4.1.4 QUADRO RADIOLÓGICO DA SPCVH	31
4.1.5. FLUXOGRAMA PARA DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA SPCVH	35
4.1.6. CONSIDERAÇÕES SOBRE O TRATAMENTO DA SPCVH	36
4.1.7. AVALIAÇÃO TARDIA DE PACIENTES QUE TIVERAM SPCVH	39
4.2. INQUÉRITO SOROLÓGICO PARA <i>HANTAVIRUS</i> EM JARDINÓPOLIS	40
4.2.1. PERFIL E ANÁLISE DE REPRESENTATIVIDADE DA POPULAÇÃO PARTICIPANTE	40
4.2.2. POSITIVIDADE GERAL DE ANTICORPOS PARA <i>HANTAVIRUS</i>	41
4.2.3. POSITIVIDADE SEGUNDO O SEXO	41
4.2.4. POSITIVIDADE SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA	42
4.2.5. POSITIVIDADE SEGUNDO O LOCAL DE ATIVIDADE PROFISSIONAL	43
4.2.6. POSITIVIDADE SEGUNDO O CONTATO COM ROEDORES	44
4.2.7. POSITIVIDADE SEGUNDO A HABITAÇÃO URBANA OU RURAL	44
4.2.8. POSITIVIDADE SEGUNDO O ANTECEDENTE DE PNEUMONIA GRAVE	45
4.2.9. TÍTULOS PARA <i>HANTAVIRUS</i> DAS AMOSTRAS DE SANGUE DOS PARTICIPANTES DO INQUÉRITO SOROLÓGICO	45
5. DISCUSSÃO.....	46
5.1 ESTUDO DE SÉRIE DE CASOS	46
5.2. INQUÉRITO SOROLÓGICO	51
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
8. SUMMARY	69

1. Introdução

Os *Hantavirus* causam doenças humanas graves (Pereira et al., 1998). São vírus de roedores que, na Ásia e Europa, causam febre hemorrágica com síndrome renal, doença conhecida desde 1930, com casos ocorrendo na China, Coréia, Finlândia e Rússia. A letalidade por esta doença varia de 10 a 12% (Kimura, 1980). Uma nova doença, que ocorre no continente americano, a Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por *Hantavirus* (SPCVH), foi descrita pela primeira vez nos EUA, em 1993, durante surto ocorrido entre índios navajos na região de Four Corners (Nolte et al., 1995; Ksiazek et al., 1995)

As hantaviroses são zoonoses de roedores. Estes pertencem a diferentes espécies que habitam diferentes lugares e abrigam diferentes cepas virais, aparentemente sem ficarem doentes. Estes vírus teriam co-evoluído a partir de um ancestral comum que, por sua vez, também infectava um outro roedor ancestral, assim se transmitindo para praticamente todas as espécies atuais de roedores (Schmaljohn et al., 1997).

Os *Hantavirus* americanos têm sua evolução em íntimo relacionamento com a de seus animais reservatórios, os quais são *Rodentia*, *Muridae* da subfamília *Sigmodontinae*. Os roedores mantêm infecção inaparente, persistente e os vírus podem ser detectados em diversos órgãos do animal, mesmo decorrido meses após o contágio (Mantooth et al., 2001).

Em 1993, uma epidemia inesperada de pneumopatia infecciosa grave, na região sudoeste dos Estados Unidos, foi pela primeira vez reconhecida como uma hantavirose (Nolte et al., 1995; Ksiazek et al., 1995). Esta doença, denominada recentemente no Brasil como Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por *Hantavirus* (SPCVH), devido ao choque cardiogênico e ao acometimento vascular que acompanham a pneumopatia grave, vem sendo observada em todo o continente americano. *Hantavirus* foram isolados ou tiveram seus genomas detectados em materiais provenientes tanto de pacientes como de roedores (Parrington et al., 1991; Johnson et al., 1999; Coimbra et al., 1998; Mantooth et al., 2001; Williams et al., 2002; Krüger et al., 2001).

A partir de 1993, foram isolados os *Hantavirus* Sin Nombre, New York e Bayou nos EUA, os vírus Los Andes na Argentina, Rio Mamoré na Bolívia e Laguna Negra no Paraguai (Levis et al., 1998; Xiao et al., 1994; Johnson et al., 1997; Nolte et al., 1995). Também outros *Hantavirus* foram encontrados em roedores nas Américas. Um deles, o Prospect Hill, foi obtido de *Microtus pennsylvanicus* nos Estados Unidos e no Canadá (Parrington et al., 1991). Sobre este vírus, não há relato de causar doença humana. Os vírus denominados Juquitiba, Araraquara, Franca e Castelo dos

Sonhos tiveram genoma detectado e são associados à doença humana no Brasil (Johnson et al., 1999).

1.1. Os Hantavirus

Os *Hantavirus* compreendem um gênero de microorganismos pertencente à família *Bunyaviridae*. A família *Bunyaviridae* inclui mais de 300 vírus distintos, compreendidos em 4 gêneros: *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus* (Mertz, 1997). A grande maioria destes microorganismos são arbovírus transmitidos por mosquitos flebótomos ou carrapatos e mantidos na natureza como agentes causadores de zoonoses (LeDuc et al., 1985; Ferreira et al., 1998). Fazem exceção os *Hantavirus*, que infectam roedores e têm mecanismo de transmissão relacionado à inalação de aerossóis das excretas, urina e fezes desses animais (Schmaljohn & Hjelle, 1997; Levis et al., 1998).

No Brasil, foram isoladas dezenas de vírus da família *Bunyaviridae*, sendo o mais importante deles, do ponto de vista epidemiológico, o vírus Oropouche, por causar epidemias extensas na região Amazônica, a febre do Oropouche (Schmaljohn & Hjelle, 1997).

Os *Bunyaviridae* são vírus de RNA, esféricos e envelopados, medindo de 80 a 120 nm, que possuem projeções glicoprotêicas na superfície. Uma partícula de *Bunyaviridae*, à microscopia eletrônica, encontra-se mostrada na Figura 1. Têm na composição química 2% de RNA, 58% de proteínas, 33% de lipídios e 7% de carboidratos (vírus Uukuniemi) (Mertz, 1997). O RNA é de fita simples, tri-segmentado e com polaridade negativa (RNA^c). Os segmentos de RNA viral são denominados: grande (L), com 6533 nucleotídeos, médio (M), com 3616 nucleotídeos e pequeno (S), com 1696 nucleotídeos, todos para o vírus Hantaan, encontrado no Velho Mundo, continente Europeu e Ásia (Schmaljohn et al., 1987; Elliott, 1989; Schmaljohn, 1997)

Também no processo replicativo do segmento S, os *Bunyavirus* codificam a proteína do nucleocapsídeo viral N. A cadeia aberta de leitura da nucleoproteína N encontra-se localizada na primeira metade do segmento S, próxima à extremidade 5' (Schmaljohn et al., 1987; Elliot, 1989; Schmaljohn, 2001).

Os 3 segmentos de RNA possuem tamanho variado entre os diferentes gêneros da família *Bunyaviridae* e as sequências 5' e 3' terminais destes segmentos possuem 8 a 11 nucleotídeos iguais para todos os segmentos, que são, provavelmente, comuns a todos os vírus do gênero. As sequências nucleotídicas terminais comuns ligam-se de forma estável, não co-valente, com pareamento de

bases, o que permite aos segmentos apresentarem-se em forma circular (Schmaljohn et al., 1996). As partículas virais carregam, também, uma polimerase (cap-dependente), de 240 a 260 kD, denominada L. As extremidades dos segmentos de RNA servem como sítios de reconhecimento para a polimerase viral (Schmaljohn et al., 1996). A estrutura de um *Hantavirus* é mostrada na Figura 1.

Figura 1 – Desenho esquemático de um *Hantavirus* e da replicação de seu RNA.

1.2. Replicação dos *Hantavirus*

A infecção por vírus da família *Bunyaviridae*, incluindo os *Hantavirus*, inicia-se pela ligação do microorganismo à membrana celular, sendo ligantes a proteína G1 e a G2 (Mertz, 1997). Os vírus invadem a célula, provavelmente por endocitose e fundem seus envelopes a membranas endossômicas, o que permite ao nucleocapsídeo viral atingir o citoplasma. Caracteristicamente, o genoma viral permanece como ribonucleoproteína, sem desnudamento total do capsídeo, que se apresenta com formato circular, associado a numerosas cópias da proteína N e poucas cópias da proteína L (RNA polimerase) (Mertz, 1997; Schmaljohn et al., 1996). Primeiramente, utilizando a polimerase viral, ocorre uma transcrição primária de RNA de polaridade negativa do vírus a RNA mensageiro ou a RNA complementar, que atua como um molde de polaridade positiva utilizado na replicação do genoma viral. Em seguida, em ribossomos livres, inicia-se uma rápida tradução dos RNAm dos segmentos L e S. As proteínas N e NSs de *Phlebovirus* estão presentes no citoplasma da

célula infectada 2 horas após a infecção. A tradução também ocorre com o RNAm de M, o qual se liga a ribossomas de membrana e ali ocorre a síntese de uma poliproteína. Em determinado momento, a polimerase viral muda sua função da transcrição primária de RNAm do genoma viral para a replicação do genoma da progênie (Schmaljohn et al., 1997). Inicia-se a transcrição do RNA (+) complementar, a partir do terminal 3', produzindo-se o RNA (-) encapsidado na progênie viral.

A poliproteína codificada pelo segmento M é clivada formando G1 e G2, as quais são, em seguida, glicosiladas. Da clivagem resultam, também, proteínas não estruturais, com 14 e 48 kD. As glicoproteínas possuem domínios transmembrana, indicando área de ancoramento em membrana e sequências hidrofóbicas carboxi-terminais (Schmaljohn et al., 1997). A montagem viral ocorre após acúmulo de G1 e G2 junto ao aparelho de Golgi e, em seguida, a partícula viral brota neste aparelho. Finalmente, a progênie viral é liberada por pinocitose reversa, com fusão das membranas das vesículas citoplasmáticas à membrana celular (Schmaljohn et al., 1997).

1.3. Hantavíroses no Brasil

Um *Hantavirus* foi isolado pela primeira vez no Brasil, no Pará, de um *Rattus norvegicus*, na década de 80 (LeDuc et al., 1985). Também, demonstrou-se presença de anticorpos para o vírus Hantaan, de origem asiática, em soros de ratos de Belém-PA, São Paulo-SP e Recife-PE. Numa série com 212 soros de pacientes da região Norte do Brasil com suspeita de leptospirose, encontrou-se IgG para Hantaan em 8,4% e IgM em 1,9% (Vasconcelos et al., 1997). Em São Paulo, em 1976, 5 de 409 doentes internados com diagnóstico clínico de leptospirose apresentavam IgM para Hantaan, ou seja, 1,2% destes casos (Vasconcelos et al., 1997). Em 1993, três indivíduos moradores da área rural de Jucituba, SP, tiveram enfermidade aguda caracterizada por febre, cefaléia, prostração, náuseas e vômitos. Dois desses pacientes evoluíram com insuficiência respiratória aguda e foram a óbito. Exames sorológicos destes casos confirmaram o diagnóstico de hantavirose, evidenciando o primeiro surto conhecido de SPCVH no Brasil (Figueiredo et al., 1999).

Entre 1998 e fevereiro de 2002, 174 casos da SPCVH foram notificados no Brasil, causando 60 óbitos (letalidade de 46%). Dentre estes casos, 95 ocorreram na Região Sul e 50 na Região Sudeste. No Estado de São Paulo, foram 31 casos e a maioria deles ocorreu na Região de Ribeirão Preto, 17 casos (Elkhoury, 2000; Ministério da Saúde do Brasil, 2001). Os 14 casos de SPCVH ocorridos entre 1998 e 2001 foram estudados como parte deste trabalho.

Do sangue de 3 pacientes, um de Castelo dos Sonhos em Mato Grosso, um de Franca e outro de Araraquara, só foi possível amplificar por RT-PCR parte do genoma viral, na região dos genes de S, 394 nucleotídeos (nt), G1, 259 nt e G2, 139 nt. Para G2, observou-se similaridade de 78,5% entre o *Hantavirus* de Mato Grosso, Castelo dos Sonhos e os de São Paulo, Araraquara e Franca. Também, observou-se similaridade de 78,9 - 82,8% entre o *Hantavirus* brasileiro Araraquara e o argentino Andes (Levis et al., 1998; Green et al., 1998; Figueiredo et al., 1998). Observa-se uma clara similaridade quanto à filogênese para os *Hantavirus* sul-americanos.

1.4. Epidemiologia da hantavirose

O mecanismo habitual de infecção humana, que leva à SPCVH, relaciona-se à inalação de aerossóis contendo excretas de roedores contendo o *Hantavirus*. Estudo efetuado no Estado de São Paulo, mostrou locais com alta densidade populacional de roedores silvestres e nos animais capturados evidenciaram-se níveis elevados de anticorpos contra *Hantavirus* no “rato do rabo peludo” (*Bolomys lasiurus*), no “rato da mata” (*Akodon sp.*) e no “ratinho do arroz” (*Oligoryzomys sp.*) (Green et al., 1998; Koster et al., 1996). Acredita-se que estes 3 roedores silvestres, mostrados na Figura 2, sejam reservatórios de vírus que causam SPCVH no Brasil.

Akodon cursor

Bolomys laziurus

Olygoryzomys negripis

Figura 2- Roedores reservatórios de *Hantavirus* causadores da SPCVH.

A letalidade por SPCVH no Brasil é de 46%, similar à observada no surto dos EUA em 1993, 58%, e na Argentina em 1996, 50% (Schmaljohn & Hjelle, 1997; Padula et al., 2000; Cantoni et al., 1997; Castillo et al., 2001).

Considerando a descrição recente desta doença, que não é bem conhecida pela comunidade médica do país, é possível que se tenham diagnosticado apenas os casos gravíssimos de SPCVH; corrobora esta idéia a presença de 4 soros com anticorpos para *Hantavirus* entre 45 contactantes dos 3 pacientes de Juquitiba, em 1993 (Vasconcelos et al., 1997).

Inquérito sorológico piloto, visando a detectar os níveis de anticorpos para *Hantavirus* na população da região de Ribeirão Preto, foi desenvolvido em 1999, tendo sido processados 567 soros das localidades de Guariba, Jardinópolis e Ribeirão Preto, por ELISA utilizando antígenos do vírus Sin Nombre. Observou-se neste estudo uma positividade de 1,23%, sendo que esta foi significativamente mais elevada nos soros oriundos do município de Jardinópolis, 4,5% (Holmes et al., 2000).

Transmissão interpessoal de *Hantavirus* foi descrita em surto argentino ocorrido na região de Bariloche, em 1996, causado pelo vírus Andes. Evidências mostram que ocorreu transmissão interpessoal do vírus entre os pacientes com SPCVH (Padula et al., 1998; Wells et al., 1997). Neste surto, 5 pacientes eram médicos e alguns outros funcionários de hospital, sendo que um médico e um familiar de paciente infectaram-se pelo contato com outros pacientes, em Buenos Aires. A transmissão interpessoal do vírus, observada nesse surto, teria ocorrido por contato direto ou inalação de aerossóis e fômites contaminados. Evidências moleculares observadas entre genomas virais detectados de diferentes casos confirmam a transmissão interpessoal ocorrida no surto argentino (Padula et al., 1998). A transmissão interpessoal de *Hantavirus* foi também suspeitada em surto pelo mesmo vírus no Chile e, recentemente, pode ter ocorrido em 5 membros de uma mesma família da zona rural do estado de Santa Catarina, Brasil (Elkhoury et al., 2000).

1.5. Patogênese da SPCVH

Os *Hantavirus* americanos utilizam $\beta 3$ integrinas como receptores para infectar as células (Gravilovskaya et al., 1998). Estas proteínas compõem as *tight-junctions* que unem células endoteliais e fecham a barreira alvéolo-capilar. A infecção, provavelmente, desencadeia intensa resposta imune humoral e celular, no endotélio vascular, principalmente em localização pulmonar.

Em consequência da infecção do endotélio capilar e desta agressão imune, ocorre extravasamento de líquidos e edema pulmonar, levando à insuficiência respiratória. O edema pulmonar coincide com queda rápida da viremia. As plaquetas, que também possuem $\beta 3$ integrinas, são infectadas pelos *Hantavirus*, ocorrendo trombocitopenia e redução da adesividade plaquetária, o que explica fenômenos hemorrágicos nesses pacientes (Gravilovskaya et al., 1998).

O exame anátomo-patológico dos pulmões de casos fatais por SPCVH mostra edema alveolar difuso, membranas hialinas e infiltrado intersticial linfocitário. O estado preservado em que se encontram as células endoteliais nos pulmões, associado à hemoconcentração e à presença, em alguns casos, de derrames pleurais, sugere que a SPCVH manifesta-se com extravasamento de líquidos dos capilares para interstício e alvéolos, o que levaria à grave insuficiência respiratória que estes doentes apresentam. Também encontram-se no sangue, interstícios pulmonares, espaços portais hepáticos e no baço células semelhantes a linfócitos atípicos, chamadas imunoblastos (Nolte et al., 1995; Schmaljohn & Hjelle, 1997; Wells et al., 1997; Koster et al., 1996; McKee et al., 1991; Zeitz et al., 1995).

Presença de partículas virais e antígenos de *Hantavirus* são descritas nas células endoteliais de seres humanos infectados, bem como em roedores. O vírus foi observado em endotélio pulmonar, renal, cardíaco, hepático, esplênico e em tecido adiposo. Não foram observados sinais de miocardite. Altas cargas virais estão associadas a maior gravidade do edema pulmonar (Terajima et al., 1999) (Schmaljohn & Hjelle, 1997; Wells et al., 1997; Centers for Disease Control and Prevention CDC, 1994).

O quadro de choque na SPCVH tem mecanismo fisiopatológico pouco conhecido, porém observa-se ausência de fenômeno inflamatório no miocárdio dos casos fatais. Esse quadro está associado ao período de baixos níveis de anticorpos neutralizantes contra o vírus. Estudo sobre a distribuição de frequências fenotípicas em pacientes com SPCVH, mostrou associação entre alelos HLA-B, haplótipos MHC: B35 e DR14 e mortalidade por choque na SPCVH. Sabendo-se que a região dos genes MHC associa-se ao controle da liberação do TNF, como alelo hipersecretor, e que existem altos títulos de TNF no sangue dos pacientes com SPCVH, supõe-se então que o TNF tenha relevante participação no choque cardiogênico da SPCVH, atuando como depressor da função miocárdica (Hallin et al., 1996; Figueiredo et al., 1998; Zaki et al., 1995). Considerando este fato e a hipovolemia causada pelo extravasamento de líquidos nos capilares pulmonares podemos inferir então a ocorrência de um choque misto na SPCVH.

1.6. Diagnóstico laboratorial das hantaviroses

O exame complementar mais comumente utilizado no Brasil, para diagnóstico da SPCVH, é o teste sorológico de ELISA. Este é realizado de modo indireto para detecção de anticorpos IgG ou por método de captura, para detecção de anticorpos IgM. Para tanto, tem-se utilizado antígenos dos *Hantavirus* Sin Nombre ou Andes, fornecidos pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), dos Estados Unidos ou pelo Instituto Carlos Malbrán, da Argentina (Padula P et al., 2000). Estes antígenos são produzidos por purificação direta do material viral após inativação ou, preferencialmente, por clonagem e expressão de genes virais que passam a produzir a sua proteína antigênica em bactéria. Comumente, utilizam-se como antígenos a proteína N do nucleocapsídeo viral, ou as glicoproteínas G1 e G2 do envelope viral. Outros métodos sorológicos menos utilizados incluem a imunofluorescência indireta com células infectadas por *Hantavirus* em *spot-slides* e o *Westernblot* (Hjelle et al., 1994). É importante ressaltar que os anticorpos IgM específicos podem ser detectados desde o primeiro dia da SPCVH. Métodos sorológicos também encontram aplicação em inquéritos populacionais.

O isolamento de *Hantavirus* a partir de materiais clínicos de seres humanos com SPCVH é difícil e pode ser feito por inoculação em células Vero do clone E6, oriundas de rim de macaco verde africano. Entretanto, o manuseio das amostras clínicas e o isolamento viral deve ser feito em laboratórios de segurança do nível 3. São laboratórios adequados ao trabalho com agentes patogênicos, potencialmente letais, e construídos com equipamentos para descontaminação e filtros de alta eficiência para renovação do ar. O pessoal técnico recebe treinamento especial e paramenta-se devidamente, além de utilizar máscaras com filtro de ar para proteção respiratória. Talvez por este motivo, ainda não foram isolados no Brasil *Hantavirus* que causam a SPCVH, havendo apenas fragmentos de genomas virais detectados por RT-PCR (Figueiredo et al., 1998). A reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR), amplificando fragmentos do genoma viral (Figueiredo et al., 1998; Terajima et al., 1999). É possível que anticorpos produzidos pelos pacientes durante a doença dificultem o isolamento viral (Sambrook et al., 1989; Dekonenko et al., 1997). Para isolamento do vírus causador de casos humanos, prefere-se ir ao local onde ocorreu a infecção e coletar roedores, dos quais o *Hantavirus* pode ser isolado com facilidade. Também, a RT-PCR e a sorologia podem ser feitas em tecidos e sangue destes roedores.

A RT-PCR é um método de diagnóstico virológico que se mostra rápido e menos laborioso que o isolamento viral, não exigindo condições L3 de segurança para sua execução. A RT-PCR, pode ser efetuada após extração de RNA, diretamente no sangue total ou soro de pacientes com a SPCVH ou materiais de roedores, detectando presença do genoma viral. Em trabalho que vem sendo desenvolvido em nosso laboratório, padronizou-se com bons resultados técnica de RT-*nested*-PCR para uso rotineiro no diagnóstico de hantavirose, a partir do sangue dos pacientes (Duchin et al., 1994; Schmaljohn & Hjelle, 1997).

A detecção de seqüências nucleotídicas do genoma viral, obtidas de *amplicons* em RT-PCR a partir de tecidos ou sangue de pacientes com SPCVH, ou de tecidos de roedores, permite análise filogenética do vírus detectado. Esta análise permite um melhor conhecimento do vírus, inclusive permitindo, por analogia, inferências quanto a seus roedores-reservatórios.

Materiais de necropsia de casos fatais de SPCVH, como pulmões e outros órgãos, podem ser testados por método imunohistoquímico e de hibridação, detectando a presença viral com o tecido visualizado ao microscópio, ou por RT-PCR após extração de RNA tissular (Jenison et al., 19954).

1.7. A Região de Ribeirão Preto e o Município de Jardinópolis

Ribeirão Preto possui aproximadamente 500.000 habitantes (IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2000), localiza-se a 21° 11'S, 47° 49'W, na região nordeste do Estado de São Paulo e é centro comercial e prestador de serviços em educação, saúde etc. de uma região com aproximadamente 3.500.000 habitantes. A região, mostrada na Figura 3, é montanhosa, com 400 a 1000m de altitude e entremeada por vales. O clima é tropical quente e úmido, com inverno seco. A mais importante atividade rural, que levou nas últimas quatro décadas ao desmatamento quase total da região, é a agroindústria da cana de açúcar.

O município de Jardinópolis, localizado na região de Ribeirão Preto (Nordeste do Estado) e situado em altitude de 589 m, está a 28 km de Ribeirão Preto e a 333 km de São Paulo. Faz divisas com Ribeirão Preto, Brodowski, Sertãozinho, Batatais, Sales Oliveira e Pontal, como mostra a Figura 3. Sua área é de 504 km² e a população de 30.723 habitantes. A economia é basicamente agrícola, com culturas principais de milho, soja, amendoim, manga, abacate e cana de açúcar (IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2000).

Figura 3 – Mapa da região de Ribeirão Preto (Nordeste do Estado de São Paulo) localizando as cidades de Ribeirão Preto e Jardinópolis.

2. Objetivos

- Estudar o quadro clínico e o perfil dos exames complementares, bem como o tratamento a que foram submetidos pacientes da região de Ribeirão Preto com Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por *Hantavirus* (SPCVH), no período de 1998 a 2001.
- Estudar a evolução tardia de pacientes da região de Ribeirão Preto sobreviventes de SPCVH.
- Estudar a frequência das infecções por *Hantavirus* na região de Ribeirão Preto, determinando níveis de anticorpos na população de Jardinópolis, SP; e relacionando estes níveis com dados pessoais referidos pelos participantes do inquérito, tais como: idade, sexo, antecedentes mórbidos e profissionais, local de habitação e contato com roedores.

3. Material e Métodos

Esta Dissertação inclui um estudo de série de casos de SPCVH e um inquérito sorológico para *Hantavirus*.

O processamento das amostras clínicas do inquérito sorológico para detecção de anticorpos contra *Hantavirus* foi realizado na Unidade Multidepartamental de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

As atividades com pacientes e materiais clínicos, realizados como parte deste trabalho, foram aprovadas pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (processo número 0825/99, fevereiro de 1999).

3.1. Estudo de Série de Casos com SPCVH

Ao iniciarmos este Projeto de Pesquisa, prestamos um trabalho de utilidade pública que, também, visou a facilitar nosso encontro de dados sobre pacientes com a SPCVH. Entramos em contato com a Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde, com os serviços que fazem atendimento de urgências e com os centros de terapia intensiva de toda a região de Ribeirão Preto, promovendo um trabalho educativo, alertando médicos e enfermeiros para a gravidade da doença, necessidade do diagnóstico precoce e do tratamento adequado. Nessa ocasião, colocamo-nos à disposição para acompanhamento e coleta de amostras, visando ao diagnóstico de casos suspeitos.

Ocorreram 14 casos de SPCVH entre 1998 e 2001, que são mostrados na Tabela 1. Todos os casos tiveram diagnóstico confirmado por teste sorológico de ELISA, detectando anticorpos do tipo IgM contra antígenos do *Hantavirus* Sin Nombre, tendo como única exceção o paciente AGS, que teve este diagnóstico realizado em nosso laboratório, utilizando a metodologia de ELISA explicada abaixo. Destes casos, anotou-se sinais, sintomas, resultados de exames complementares e dados de necropsias. Estes dados foram obtidos através de pesquisa em prontuários do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, de prontuários do Hospital São Francisco de Ribeirão Preto e dados do Serviço de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, região de Ribeirão Preto (DIR 18).

Tabela 1 - Casos de Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavirus ocorridos na Região de Ribeirão Preto entre 1998 e 2001, classificados conforme a data de internação hospitalar.

Paciente	Internação	Idade	Sexo	Profissão	Procedência	Evolução
JAS	07/05/98	55	M	Lavrador	Guariba	Óbito
FOVA	16/05/98	38	M	Fazendeiro	Guariba	Óbito
AGS	11/11/98	54	M	Pintor	Ribeirão Preto	Óbito
DLM	04/05/99	26	M	Fazendeiro	Jardinópolis	Óbito
VSS	06/05/99	29	M	Motorista	Pontal	Alta
AJM	08/06/99	32	M	Tec. agropec.	Cajuru	Alta
CB	21/06/99	13	F	Estudante	Cajuru	Alta
GSP	28/06/99	21	M	Lavrador	Cássia dos Coqueiros	Alta
UP	27/04/00	45	M	Motorista	Monte Alto	Óbito
NBI	02/02/01	25	F	Func. pedagógico	Ribeirão Preto	Óbito
JPM	23/04/01	29	M	Eng. agrônomo	Batatais	Alta
LSO	21/05/01	35	M	Motorista	Ribeirão Preto	Óbito
ZCM	15/06/01	45	F	Do Lar	Monte Alto	Óbito
AJS	22/06/01	16	M	Lavrador	Cássia dos Coqueiros	Alta

Os seguintes dados relativos à identificação, atividades profissionais e hábitos foram pesquisados para o estudo: nome, idade, sexo, profissão, procedência, tipo de habitação, hábitos e deslocamento de trabalho ou lazer e história clínica com a data de internação hospitalar; observando fatores de risco como participação em desmatamento, corte de árvore, aração de terra, contato com fardos de lã, lenha, capim, colheita, plantio, moagem ou armazenamento de grãos, lazer (caça, pesca, camping e outros), limpeza de locais com vestígios de ratos: sótão, porão, celeiro, galpão, casa abandonada e depósitos.

Quanto à história clínica, pesquisou-se sintomas de adinamia, febre, cefaléia, mialgias, tosse, dispnéia, fenômenos hemorrágicos, diarreia, hipotensão, choque, oligúria, hepatoesplenomegalia, cianose e exantemas. Estes dados foram anotados de forma cronológica, observando a data de início dos sintomas (DIS) e a data de internação do paciente no hospital (DI).

Quanto a exames complementares, pesquisou-se resultados de hemogramas, testes bioquímicos do sangue, provas de função hepática, renal e de coagulação, além de gasometria arterial e resultados de testes sorológicos, observando a data em que foram efetuados. Foram realizados exames radiológicos de todos os pacientes, tendo sido os mesmos analisados.

Quanto ao tratamento dado aos pacientes, pesquisou-se volume de hidratação a cada 24 horas (h), tipo de líquido infundido, balanço hídrico, medicamentos ministrados (antibióticos, antivirais,

corticóides, diuréticos, aminas vasoativas) e suas doses correspondentes, além do suporte ventilatório utilizado, desde a aplicação de O₂ em cateter nasal até ventilação mecânica.

3.1.1. Avaliação tardia de pacientes que tiveram SPCVH

Os 6 pacientes da região de Ribeirão Preto que tiveram SPCVH e sobreviveram foram convocados, por carta e/ou contato telefônico, para uma avaliação clínica, no segundo semestre de 2001. Destes, 1 recusou-se a participar, 1 desapareceu do endereço e 2 faltaram, comparecendo apenas 2, que foram avaliados em consulta médica, questionados a respeito de intercorrências verificadas após a alta, atividades de vida profissional e social, visando a detectar possíveis seqüelas de função respiratória, renal, hematológica e neurológica, incluindo funções cognitivas. Os pacientes foram examinados clinicamente e submetidos aos seguintes exames laboratoriais: hemograma com contagem de plaquetas séricas, dosagens dos teores séricos de sódio, potássio, cálcio, uréia e creatinina. Foram também realizados: exames de urina rotina, provas de função pulmonar, espirometria e difusão de CO₂ e tomografia computadorizada de tórax.

3.2. Inquérito sorológico para *Hantavirus* em Jardinópolis

3.2.1. Planejamento

Visando a conhecer os níveis de anticorpos para *Hantavirus* em uma localidade da região de Ribeirão Preto, planejou-se inquérito sorológico na população do município de Jardinópolis, de forma que os dados obtidos representassem a população como um todo.

Foram selecionados como participantes deste estudo indivíduos de 15 a 70 anos, com base no conhecimento prévio de que a SPCVH acomete adultos em fase de plenitude física e de trabalho.

Para calcular o tamanho amostral, que representasse a população da cidade de Jardinópolis, utilizou-se o método de amostragem proporcional para uma determinada população e como probabilidade para ocorrência de indivíduos apresentando anticorpos para *Hantavirus* $p = 0,05$, com base no resultado de estudo piloto realizado em 1999, quando analisou-se 112 soros de moradores de Jardinópolis e obteve-se aproximadamente 5% de positividade (Holmes et al., 2000). O cálculo do tamanho amostral foi realizado utilizando o programa de computador Epi-Info (CDC, USA, 1996), considerando a população de Jardinópolis entre 15 e 70 anos de 20.865 moradores e uma ocorrência provável de infecção da ordem de 5%. Obteve-se um tamanho amostral (n) mínimo de 446 particip-

antes, visto que trabalhamos com mais de um morador em cada casa, distribuídos proporcionalmente, para evitar o efeito *cluster*.

$$N = \frac{Z^2(PxQ)}{D^2}$$

Onde: Z= 1,96; P= 5%; Q=95%; D=2; e ao resultado de N= 456 aplicou-se o fator de correção para populações finitas, resultando o valor de 446.

Para uma distribuição homogênea dos participantes pela cidade, utilizou-se a metodologia de *cluster in two steps*. Assim, primeiramente analisou-se o mapa de cada bairro e numerou-se as 482 quadras de toda a cidade. Após a exclusão das que sediavam indústrias, grandes estabelecimentos, locais inabitados, escolas, praças e aquelas com apenas 1 ou 2 casas, restaram 282 quadras residenciais. Em cada quadra, numerou-se todas as casas existentes e, dentre elas, uma foi sorteada. Foi considerada *casa vazia* aquela sorteada onde não fosse encontrado ninguém após 3 visitas, sendo a mesma substituída pela casa subsequente em sentido horário na quadra. Também, foram substituídas as casas onde os habitantes, após esclarecimento e orientação, recusaram-se a participar do inquérito.

Nas casas habitadas, foram listados os moradores de 15 a 70 anos e, destes, 2 foram sorteados para participação no inquérito sorológico. Para compensar casas sorteadas em que havia apenas um habitante, em algumas quadras sorteu-se mais de uma casa, tendo participado mais de 2 habitantes nessas quadras. Todas as quadras foram representadas com a participação de pelo menos 2 indivíduos.

Na zona rural, com base em uma lista de todas as propriedades rurais locais, fornecida pelo Serviço de Vacinação do Centro de Saúde de Jardinópolis, sorteu-se 4 sítios ou fazendas espalhados ao norte, ao sul e a oeste do Município e que possuíam o maior número de moradores. Nos sítios e fazendas sorteados, coletou-se sangue de todos os moradores de 15 a 70 anos.

3.2.2. Execução do Inquérito

Preparou-se para os participantes uma ficha de coleta com questionário resumido, contendo: Identificação (idade, sexo, cor, procedência, atividade profissional, endereço, telefone); Condições

de Saúde (moléstia atual, medicamentos em uso, pneumonia grave pregressa caracterizada pela necessidade de internação) e Ambiente (tipo de moradia, número de moradores na casa, esgoto, coleta de lixo, celeiro, presença de roedores nas proximidades).

A população de Jardinópolis foi previamente conscientizada e alertada sobre a hantavirose e sobre a importância do inquérito sorológico através dos meios de comunicação da cidade, jornais, programas de rádio e televisão.

O inquérito sorológico foi realizado entre 20 de abril e 10 de maio de 2001, por 2 equipes de campo. Estas equipes foram compostas por um entrevistador e um auxiliar de enfermagem paramentados com jaleco branco e luva de borracha para coleta de sangue. Os membros das equipes foram previamente conscientizados a respeito da gravidade da moléstia e da importância do trabalho. Foram orientados quanto aos esclarecimentos e ao preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, fornecido pela Comissão de Ética do HC-FMRP. Também, praticaram previamente quanto à técnica de entrevista e ao preenchimento dos critérios de inclusão. Sabiam decidir na hora e no local com relação à exclusão e à substituição de casas e participantes. Todos os participantes, após explicações sobre o Projeto e assinatura de Termo de Consentimento, foram submetidos ao questionário e tiveram amostra de sangue colhida por micropuntura de polpa digital com microlanceta descartável e esterelizada da marca EMBRAMED, após assepsia com álcool hidratado a 96%. O sangue era embebido em 3 círculos de 1,5 cm de diâmetro contidos em tiras de papel de filtro. O auxiliar de enfermagem colhia as amostras de sangue, secava-as à temperatura ambiente e as armazenava, após juntá-las às fichas de questionário correspondentes, organizando-as para o encaminhamento ao laboratório.

3.2.3. Preparo das amostras de sangue do inquérito sorológico

No laboratório, as tiras de papel de filtro contendo as amostras do sangue dos participantes do inquérito sorológico foram numeradas e armazenadas em sacos plásticos fechados a -20 °C. Como controles positivos foi utilizado sangue de 3 pacientes com SPCVH obtidos por venopunção. Estas amostras de sangue foram colhidas previamente ao estudo e preparadas da mesma forma que as amostras do inquérito, ou seja, foram gotejados sobre o círculo no papel de filtro, identificadas, eluídas e armazenadas para serem utilizadas.

Como controles negativos, amostras de 20 indivíduos hígidos e sem antecedentes de qualquer doença pulmonar, moradores das cidades de Ribeirão Preto e Sertãozinho, colhidas com a

mesma técnica utilizada no inquérito. Estas amostras de sangue foram colhidas previamente ao estudo por venopunção e preparadas da mesma forma que as amostras do inquérito, ou seja, foram gotejadas sobre o círculo no papel de filtro, identificadas, eluídas e armazenadas para serem utilizadas.

Para o teste ELISA, picotou-se (picotador de 6mm de diâmetro) os discos embebidos em sangue contidos nas tiras de papel filtro e os picotes foram inseridos em tubos tipo Eppendorf contendo PBS-Tween na proporção de 1 disco com capacidade de embebição de 5µl para 250 µl de diluente. Os tubos permaneciam a 37 °C por 1 hora e, em seguida, eram agitados e estocados a -20°C.

3.2.4. ELISA para *Hantavirus*

O sangue dos participantes do inquérito sorológico, bem como o do paciente AGS (óbito) foram submetidos ao teste ELISA indireto, visando à detecção de IgG para *Hantavirus*, conforme mostrado no esquema da Figura 4.

Figura 4- Esquema do teste ELISA IgG para *Hantavirus*.

Para a realização do teste, primeiramente era feito bloqueio das reações inespecíficas adicionando-se aos orifícios de microplacas, com 96 orifícios da marca Costar 3590 (USA), 100 µl por cavidade de soro albumina bovina a 3% em PBS (0,01 M PO₄ e 0,15M NaCl) pH 7,4. Para escolha do bloqueador mais adequado foram realizados vários testes com soluções contendo soro

eqüino a 5% em PBS, soro caprino a 5% em PBS, soro de coelho a 5% em PBS, leite em pó desnatado a 5, 10 e 15% em PBS, gelatina a 5% em PBS e solução de soro albumina bovina a 5% em PBS. Esta última mostrou menor *background* à leitura espectrofotométrica das microplacas ao final do teste e, portanto, foi a mais adequada para uso no ELISA. Em seguida à adição da solução bloqueadora, as microplacas eram incubadas, em câmara úmida, a 37 °C, por 1h e 15 minutos (min). Em seguida era feita a lavagem dos orifícios, por 4 vezes, com solução contendo 250 µl de Tween 20 (Merck, Alemanha) para 500 ml de PBS pH 7,4 (PBS-Tween).

O antígeno recombinante da proteína N do vírus Andes foi gentilmente fornecido pela Dra. Paula Padula do Instituto Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina. Este antígeno liofilizado foi ressuspensão utilizando 500 µl de solução tampão de acetato de sódio 3M e 3,3 ml de ácido acético 3M, 2,5 ml SDS a 10%, 50 ml NaCl 5M e 60 gs de uréia. Em seguida, o antígeno hidratado foi diluído a 1/1000 em solução tampão NaH_2CO_3 e Na_2HCO_3 a 0,1M pH 9,6, utilizando-se 50µl em cada. Adicionou-se este antígeno em metade da microplaca e à outra metade adicionou-se apenas a solução tampão, no mesmo volume, conforme mostrado na Figura 5.

Em seguida, as microplacas foram incubadas a 4 °C, por 18 h. Posteriormente, descartou-se o antígeno e as mesmas foram lavadas com PBS – Tween, por 4 vezes, e secas. Neste ponto do teste, as microplacas poderiam ser processadas imediatamente ou armazenadas a -20 °C para utilização posterior.

Figura 5 - Esquema de microplaca com 96 orifícios, mostrando em vermelho os orifícios aos quais adicionou-se antígeno recombinante da proteína N do vírus Andes e, em verde, orifícios onde se adicionou apenas a solução tampão NaH_2CO_3 e Na_2HCO_3 a 0,1M pH 9,6.

Iniciando os testes, primeiramente, fez-se uma triagem de todos os soros eluidos de papel de filtro dos participantes do inquérito sorológico, bem como o do paciente AGS, visando a identificar os soros reagentes para *Hantavirus*. De todos os 818 soros, na diluição 1/50, foram adicionados 50 µl em cada orifício, em duplicata, na metade da microplaca sensibilizada com o antígeno viral e também, naquela metade contendo apenas solução tampão, conforme mostrado na Figura 6. Também, adicionou-se às duas metades da microplaca, em duplicata, na mesma diluição e volume, soros supostamente positivos (C+, de paciente com SPCVH) e pelo menos 4 soros sabidamente negativos (C-). Após a adição dos soros, as microplacas foram incubadas em câmara úmida, a 37 °C, por 1h. Em seguida, os orifícios foram lavados, por 4 vezes, com PBS-Tween.

Figura 6 - Exemplo de como foi organizada a microplaca para o ELISA de *Hantavirus* quanto à adição dos soros humanos para triagem, na diluição 1/50. C+ Soro sabidamente positivo, C- Soro sabidamente negativo.

Como próximo passo do teste, acrescentou-se um conjugado de imunoglobulina caprina anti IgG Humana (Sigma, USA), na diluição 1/2000, em solução de soro-albumina bovina a 5% em PBS.

Desta solução, preparada a fresco, foram acrescentados 50 µl a todas as cavidades da microplaca. As placas foram incubadas novamente, em câmara úmida, a 37 °C, por 1h e em seguida lavadas 4 vezes com PBS-Tween. Finalmente, acrescentou-se o substrato 2,2'-azino-di-3-ethyl-benzthiazoline sulphonate (ABTS) da marca Kirkgaard & Perry, USA. Este substrato toma coloração verde nos orifícios em que a reação é positiva, ou seja, nesses orifícios a H₂O₂, ao ser degradada, oxida o ABTS, que toma a referida coloração. O volume de ABTS por orifício era de 50 µl e incubava-se as placas por 25 min, em câmara escura, a 37°C. As microplacas foram lidas quanto às densidades óticas (DO) de cada orifício, em espectrofotômetro para microplacas Titertek Multiskan (Flow, Finlândia), utilizando o filtro de 405 nm. Exemplo de leitura efetuada em microplaca encontra-se mostrado na Figura 7.

DOs lidas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,372	0,347	0,454	0,358	0,240	0,429	0,629	0,346	0,507	0,511	0,556	0,620
B	0,363	0,290	0,268	0,247	0,324	0,302	0,343	0,257	0,272	0,325	0,366	0,630
C	0,880	0,360	0,237	0,279	0,328	0,284	0,417	0,282	0,241	0,363	0,424	0,603
D	0,850	0,329	0,332	0,243	0,330	0,228	0,240	0,193	0,172	0,415	0,408	0,827
E	0,325	0,322	0,355	0,334	0,270	0,340	0,470	0,314	0,311	0,353	0,399	0,506
F	0,257	0,254	0,255	0,229	0,265	0,257	0,304	0,260	0,233	0,259	0,331	0,560
G	0,345	0,293	0,222	0,257	0,284	0,281	0,304	0,255	0,229	0,293	0,336	0,502
H	0,331	0,310	0,269	0,242	0,273	0,232	0,269	0,251	0,233	0,319	0,190	0,216

Figura 7 - Valores de DO observados por leitura espectrofotométrica com filtro de 405 nm de microplaca utilizada no ELISA de *Hantavirus*. No quadrado verde observa-se os controles negativos, no quadrado vermelho observa-se os controles positivos e no círculo vermelho, à esquerda, observa-se um soro positivo (testado em duplicata).

Para determinação dos soros apresentando anticorpos para *Hantavirus*, primeiramente, subtraiu-se dos valores de DO em cada orifício da linha A o seu correspondente da linha E, dos da linha B os da linha F, dos da linha C os da linha G e dos da linha D os da linha H, obtendo-se os valores mostrados na Figura 8.

DO _M teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,047	0,025	0,099	0,024	-0,030	0,089	0,159	0,032	0,196	0,158	0,157	0,114
B	0,106	0,036	0,013	0,018	0,059	0,045	0,039	-0,003	0,039	0,066	0,035	0,070
C	0,535	0,067	0,015	0,022	0,044	0,003	0,113	0,027	0,012	0,070	0,088	0,101
D	0,519	0,019	0,063	0,001	0,057	-0,004	-0,029	-0,058	-0,061	0,096	0,072	0,325

Figura 8 – Determinação dos soros apresentando reação positiva no ELISA para *Hantavirus*: esquema de meia microplaca mostrando valores de DO dos orifícios das linhas A, B, C e D subtraído dos valores de DO seus correspondentes das linhas E, F, G e H respectivamente. No quadrado verde observa-se os controles negativos, no quadrado

vermelho observa-se os controles positivos e no círculo vermelho, à esquerda, observa-se um soro positivo (testado em duplicata).

Foram considerados positivos os soros que superaram a média das DO nos soros negativos acrescida de 2 desvios padrões. No exemplo da Figura 8, obteve-se como DO média dos controles negativos, 0,093 e como desvio padrão 0,044; portanto, a soma da DO média dos controles negativos com 2 desvios padrões resultou em 0,180, valor de corte do teste. Com este valor de corte, pode-se observar na Figura 8 que apenas 1 dos soros supostamente positivos mostrou-se realmente positivo neste teste e que o soro de 1 participante do inquérito sorológico, testado em duplicata contida no círculo vermelho (C1 e D1), mostrou-se positivo.

Os soros apresentando anticorpos para *Hantavirus* foram separados e, numa segunda fase dos testes, foram submetidos novamente ao ELISA para *Hantavirus* visando à confirmação e, também, à titulação. Para tanto, adicionou-se os soros à microplaca, no mesmo volume anteriormente utilizados e nas diluições 1/50, 1/100, 1/400 e 1/1600. O restante do teste foi feito como descrito anteriormente e a diluição atribuída a cada soro foi a mais elevada que superava a média acrescida de 2 desvios padrões dos 4 soros negativos testados na mesma microplaca e na diluição correspondente.

3.2.5. Análise estatística dos resultados

Nas comparações para duas proporções utilizou-se o teste de Fisher e quando comparou-se mais que duas proporções utilizou-se o teste do Qui-quadrado, ambos para α de 5%. Os cálculos foram feitos utilizando o programa InStat 3.0 (GraphPad. Software Inc, USA).

4. Resultados

4.1. Estudo de Série de Casos com SPCVH

Os 14 casos de SPCVH ocorridos de 1998 até o final de 2001 foram utilizados para o estudo de série de casos de SPCVH. Alguns obtidos de maneira retrospectiva e outros por nós seguidos durante a internação hospitalar.

4.1.1. Quadro clínico da SPCVH

Nos 14 pacientes com SPCVH, observou-se febre em todos os casos; estertores pulmonares, dispnéia e tosse em 64,2%, taquicardia acompanhada de hipotensão em 64,2%; cefaléia e sintomas digestivos em 57%; adinamia e indisposição geral em 50%; fenômenos hemorrágicos como hematúria, melena, hiperfluxo menstrual, em 28,5%; mialgias em 21,4% e convulsão em 1 caso, 7,5%. Sinais e sintomas mais freqüentemente observados são mostrados na Figura 9.

Figura 9 - Sinais e sintomas mais freqüentemente observados nos 14 pacientes com SPCVH.

4.1.2 Quadro Laboratorial da SPCVH

As alterações laboratoriais mais observadas entre os pacientes com SPCVH incluíram contagem de plaquetas abaixo de $130000/\text{mm}^3$ nos 12 casos (100%) dos quais tivemos esta

informação; hemoconcentração com hematócrito maior que 55%, em 78,6% dos 14 casos; leucocitose com níveis acima de $15000/\text{mm}^3$ em 64,2% dos 14 casos; neutrofilia maior que $7000/\text{mm}^3$ e formas jovens acima de 600 bastonetes/ mm^3 também foram observadas em 64,2%, porém de apenas 10 pacientes dos quais obtivemos esta informação; alteração de função renal detectada por creatinina sérica acima de $1,5\text{mg}/100\text{ml}$, foi observada em 63,6% e hipoxemia com PO_2 inferior a 70 mmHg em 54,5% de 11 pacientes dos quais obtivemos estes dados. Portanto, no perfil laboratorial que acompanha a SPCVH ressalta-se a hemoconcentração e a redução nos níveis de plaquetas do sangue, que, inclusive, corroboram o diagnóstico clínico desta síndrome, bem como a hipóxia. As informações sobre o quadro laboratorial encontram-se apresentadas na Figura 10.

* pacientes atendidos no HCRP

Figura 10 - Alterações mais observadas em exames laboratoriais dos 14 pacientes com SPCVH.

4.1.3. Cronologia dos sinais, sintomas e alterações laboratoriais nos pacientes com SPCVH

A evolução da SPCVH mostrou-se similar nos 14 pacientes, conforme exibido na Figura 11. Os sinais e sintomas, no início, cursaram com febre, astenia e cefaléia. Deve-se ressaltar que a doença não se iniciou com tosse, coriza, ou outros sintomas respiratórios. Após o terceiro dia de doença, em 24 a 48 horas, mudou o quadro com surgimento de tosse seca que, posteriormente, tornou-se produtiva, e dispnéia que de leve evoluiu para insuficiência respiratória grave. Também,

nesta fase ocorreram calafrios, náuseas e vômitos, não sendo incomum a dor abdominal e a diarreia. Este quadro acompanhou-se de taquicardia, hipotensão arterial, seguido por choque cardiocirculatório. Nesta fase da doença, além da hipoxemia, elevou-se o hematócrito e ocorreu plaquetopenia, além de elevação nos níveis de creatinina sérica.

Figura 11 - Cronologia de sinais, sintomas e alterações laboratoriais observados nos 14 pacientes com SPCVH.

4.1.4 Quadro radiológico da SPCVH

Pacientes com SPCVH apresentam ao exame radiológico de tórax, nos primeiros quatro dias do início dos sintomas, infiltrado intersticial bilateral tênue e difuso, sugerindo pneumonia atípica. Após 48 horas, a pneumopatia agrava-se e mostra-se ao exame radiológico como uma hipotransparência extensa, que se difunde por todos os campos pleuro-pulmonares. O exame radiológico de tórax dos pacientes com SPCVH tem se mostrado evolutivamente da mesma forma sugestiva, que, embora de grande importância, não é específica para o diagnóstico. Na Figura 12, a evolução radiológica da paciente CB mostra o padrão radiológico da pneumopatia que ocorre na SPCVH. Acompanham o surgimento da febre e da dispnéia, por volta do quarto dia de doença, imagens radiológicas de velamento pulmonar bilateral intersticial que vai se tornando misto, com

infiltração alveolar. Concomitante com o agravamento da insuficiência respiratória, o velamento pulmonar misto torna-se progressivamente confluyente e mais denso, acometendo praticamente todos os campos pulmonares. Nesta fase, foram tomadas medidas terapêuticas de oxigenação, como entubação oro-traqueal e ventilação mecânica. Após aproximadamente 3 dias, o quadro radiológico começou a mostrar sinais de melhora e esta remissão foi progressiva. No caso de CB, 2 semanas após o aparecimento dos sintomas, a remissão dos velamentos foi quase completa, mantendo-se no último exame, ainda, infiltrado reticular nas bases pulmonares. Na Figura 13, temos a evolução de um caso fatal da SPCVH que, na fase final, apresentava velamento praticamente completo dos campos pleuro-pulmonares, compatível com a gravíssima insuficiência respiratória apresentada pelo paciente.

Figura 12 - Evolução radiológica da paciente CB com síndrome pulmonar e cardiovascular por *Hantavirus*: no exame de 20/6/99, observa-se velamento pulmonar de padrão misto, alveolar e intersticial, com áreas de confluência nas bases; no exame de 22/6/99, observa-se aumento em extensão e densidade dos velamentos que acometem completamente os pulmões; em 27/6/99, observa-se remissão progressiva dos infiltrados e que em 30/6/99 apresentam-se como reticulações apenas nas bases pulmonares.

Figura 13 - Evolução radiológica do paciente LSO, caso fatal de SPCVH.

4.1.5. Fluxograma para diagnóstico clínico da SPCVH

Com base na apresentação clínica da SPCVH observada nos 14 pacientes, elaborou-se o Fluxograma mostrado na Figura 14, com o objetivo de orientar o diagnóstico clínico de casos prováveis da doença, considerando a fase da doença em que já existe acometimento pulmonar.

Pacientes previamente saudáveis apresentando tosse e dispnéia, mostrando à radiografia torácica hipotransparência bilateral alveolar ou mista e, ao exame hematológico, plaquetopenia ($<130000/\text{mm}^3$) e hemoconcentração (hematócrito $>55\%$) são casos prováveis de SPCVH. Deverão ser imediatamente internados e mantidos em local com acesso a recursos de terapia intensiva.

Figura 14 – Fluxograma para diagnóstico clínico de casos prováveis da SPCVH.
HT = Hematócrito; PL = Contagem de plaquetas no sangue.

4.1.6. Considerações sobre o tratamento da SPCVH

Do total de 14 pacientes de SPCVH, 11 foram atendidos no HCRP e o tratamento a que foram submetidos é mostrado e analisado na Tabela 2. Observou-se como diferença entre o tratamento a que foram submetidos os casos fatais (JAS, FVL, AGS, DLM, LSO e ZCM) e os sobreviventes (VSS, CB, GSP, AJM e AJS) que o diagnóstico, em 5 casos fatais, foi suspeitado apenas à necropsia. Quanto aos sobreviventes, a suspeita diagnóstica de SPCVH foi feita entre o 1º e o 2º dia de internação em todos os casos. Esta diferença mostrou-se significante ($p=0,0152$). A presença de choque foi observada em 8 dos 11 pacientes analisados e não teve associação com óbito. A oxigenação para tratamento da insuficiência respiratória, utilizando ventilação mecânica, na maioria dos casos ocorreu no primeiro dia de internação e não teve associação com sobrevida, assim como o uso de aminas vasoativas e de corticosteróides. Em todos os casos, o diagnóstico sorológico confirmatório de hantavirose só foi informado durante a convalescença ou após o óbito desses pacientes. Desconhecendo-se a etiologia da grave síndrome infecciosa, todos os pacientes fizeram uso de antimicrobianos visando a atuar sobre bactérias que incluíam *Staphylococcus aureus*,

Mycoplasma sp, *Legionella sp* e fungos como *Pneumocystis carinii*. Observa-se que 4 dentre 5 sobreviventes fizeram uso de Claritromicina, o que ocorreu apenas com 1 dos 6 casos fatais. Esta diferença não se mostrou significativa ($p=0,0801$). Por outro lado, nenhum dos pacientes fez uso de drogas antivirais, como a ribavirina. Finalmente, o paciente GSP, de 54 anos e que havia sofrido parada cardiorrespiratória prévia, sofreu morte súbita no 4º dia após a internação, quando se encontrava iniciando a convalescença. É possível que este óbito tenha decorrido de complicações de outra ordem (infarto agudo do miocárdio).

Tabela 2 – Informações sobre o tratamento a que foram submetidos 11 pacientes com Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por *Hantavirus*.

Pacientes	DIS	DIDC	GHI	CHI	DIO2	TPO2	DIPVC	QTVI	USAV	COR	ATB	EVL
JAS	4	NFF	61%	S	1°	VM	N	5,5L	S	N	Pen	OT
FVL	10	1°	53 %	S	2°	VM	1°	ID	S	S	Pen	OT
AGS	4	NFF	96 %	N	1°	VM	1°	3L	S	S	Clor Amica	OT
DLM	4	NFF	ID	S	1°	VM	N	3L	S	N	Azi Cotrim	OT
VSS	4	2°	71 %	S	1°	VM	2°	3,5L	S	N	Ceftr Cla	SB
CB	7	1°	72 %	S	1°	VM	1°	2,5L	S	N	Clor Cla Cefal	SB
GSP	5	1°	82 %	S	1°	VM	3°	3L	S	S	Genta Cla	SB
AJM	5	1°	73 %	N	1°	MF	N	2L	N	S	Cotrim Cla	SB
LSO	5	NFF	70 %	S	1°	VM	1°	3L	S	N	Cipro Genta	OT
ZCM	6	NFF	78 %	S	1°	VM	1°	>5L	N	S	Ceftr Cla	OT
AJS	3	1°	90 %	N	1°	MF	N	1L	N	N	N	SB

DIS=Dia de início dos sintomas em que houve a internação; DIDC= Dia de internação em que se fez diagnóstico clínico de Hantavirose; GHI= Grau de hipóxia à Internação (Sat O2); CHI= Presença de choque ou hipotensão à internação; DIO2= dia de início de oxigenioterapia após a internação; TPO2= Tipo de oxigenioterapia utilizada; DIPVC= Dia de internação em que se instalou a PVC; QTVI= Quantidade de volume infundido nas primeiras 24 horas; USAV= Uso de amins vasoativas; COR= Uso de corticóides; ATB= Antimicrobiano utilizado; EVL= Evolução: OT= óbito SB= sobreviveu; VM= Ventilação Mecânica; MF= Mascara Facial com O2; S= Sim; N= Não; NFF= Não foi feito. Pen= Penicilina; Clor=Cloranfenicol; Azi=Azitromicina; Ceftr=Ceftriaxona; Amica=Amicacina; Cipro=Ciprofloxacina; Genta=Gentamicina; Cla=Claritromicina; Cotrim=Cotrimoxazole.

Também, analisando separadamente a hidratação parenteral a que foram submetidos 10 dentre os 14 pacientes com SPCVH mostrados na Tabela 3, observamos associação significativa ($p=0,0152$) entre infusão de líquidos EV igual ou superior a 2500 ml nas primeiras 24h de tratamento hospitalar e evolução para o óbito.

Tabela 3 - Infusão de líquidos nas primeiras 24h de tratamento hospitalar de 10 pacientes com SPCVH e evolução da doença.

PACIENTE	INFUSÃO HÍDRICA EV NAS PRIMEIRAS 24 h (ml)	EVOLUÇÃO
JAS	5500	Óbito
AGS	6000	Óbito
DLM	3000	Óbito
VSS	2000	Alta
AJM	2000	Alta
CB	2500	Alta
GSP	3000	Alta
LSO	2750	Óbito
ZCM	5000	Óbito
AJS	1000	Alta

Ainda, suspeitamos, embora sem comprovação, que a maioria dos casos fatais tenha levado maior tempo para a chegada ao serviço terciário de emergência médica.

4.1.7. Avaliação tardia de pacientes que tiveram SPCVH

Dentre os 6 pacientes que sobreviveram à SPCVH, faltaram 2, após insistentes chamados, 1 recusou-se e 1 desapareceu, tendo comparecido às consultas de reavaliação somente 2, CB (16 anos) e VSS (31 anos), ambos 30 meses após o quadro. Nenhum referiu intercorrência ou queixa após a alta hospitalar. Ao exame clínico não se evidenciou nenhuma alteração patológica e os resultados dos exames laboratoriais mostraram-se dentro dos limites da normalidade. As tomografias de tórax de ambos os pacientes foram normais. Testes de função pulmonar foram realizados apenas para VSS, tendo mostrado resultados dentro dos limites da normalidade.

4.2. Inquérito sorológico para *Hantavirus* em Jardinópolis

4.2.1. Perfil e análise de representatividade da população participante

Participaram do inquérito sorológico 818 habitantes do município de Jardinópolis, sendo 420 homens e 398 mulheres. De 15 a 20 anos, 123 participantes; de 21 a 30 anos, 228; de 31 a 40 anos, 200; de 41 a 50 anos, 169; de 51 a 60 anos, 75 e de 61 a 70 anos, 23, conforme visualizamos na Tabela 4. Destes participantes, 725 residiam em zona urbana e 93 na zona rural.

Tabela 4: Perfil dos participantes de acordo com sexo e idade.

Sexo/Idade	15-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	Total
Masculino	63	112	104	94	41	16	430
Feminino	60	116	96	75	34	7	388
Sub-total	123	228	200	169	75	23	818

Como atividade profissional dos participantes, encontramos:

- 533 com atividade profissional urbana: 210 do lar, 36 estudantes, 21 trabalhadores domésticos, 4 eletricitas, 15 auxiliar de saúde, 21 pedreiros, 5 militares, 1 manicures, 3 marceneiros, 8 guardas noturnos, 1 jardineiro, 5 fiscais, 2 garis, 1 entregador, 34 comerciários, 8 empacotadores, 1 desenhista, 1 despachante, 2 chapeiros, 44 comerciantes, 3 confeitadeiras, 2 contadores, 1 copeira, 1 corretor, 3 costureiras, 15 operadores de caixa, 4 açougueiros, 5 balconistas, 41 auxiliares gerais, 8 secretárias, 1 sacareiro, 9 industriários, 4 encarregados, 3 mecânicos, 4 funcionários públicos e 6 profissionais liberais: 1 empresário, 2 arquitetos, 1 assistente social, 1 administrador, 1 advogado;
- 98 trabalhadores rurais: 29 motoristas, 44 trabalhadores rurais, 13 agricultores e 12 avicultores;
- 187 com outra atividade ou atividade ignorada: 43 desempregados, 12 autônomos, 132 não referiram profissão.

Também, 367 participantes referiram contato com roedores e 33 referiram antecedente de pneumonia grave.

Entretanto, obteve-se, por motivos operacionais, um número efetivo de participantes inferior ao do tamanho amostral previamente calculado (818 participantes, 725 em zona urbana e 93 em zona rural). Por outro lado, observou-se uma positividade para *Hantavirus* de 14,3% entre os participantes, que foi praticamente 3 vezes mais elevada que aquela estimada como provável (0,05).

As positivities para *Hantavirus* obtidas no município como um todo (14,3%), em zona urbana (15,3%) e em zona rural (6,5%) foram, também, avaliadas em quanto se situaram dentro do intervalo de confiança de 95%. Para tanto, aplicou-se a fórmula:

$$P = z \pm \sqrt{pq/n}$$

Onde,

$z = 1,99$ (95%);

para a população total, $p = 0,143$; $q = 1-p$ e $n = 818$;

para a população urbana, $p = 0,153$ e $n = 725$

para a população rural, $p = 0,0645$ e $n = 93$.

4.2.2. Positividade geral de anticorpos para *Hantavirus*

Dentre os 818 moradores do município de Jardinópolis, que participaram do inquérito sorológico, a positividade foi de 14,3%, ou seja, 117 participantes apresentavam anticorpos IgG para *Hantavirus* Andes. Os intervalos de confiança para a população total [11,8;16,7], para a população urbana [12,64; 17,96] e para a população rural [1,4; 11,51] mostram que as positivities observadas no presente estudo encontram-se dentro dos intervalos de confiança de 95%.

4.2.3. Positividade segundo o sexo

Dentre as 389 mulheres moradoras do município de Jardinópolis, que participaram do inquérito sorológico para *Hantavirus*, observamos a presença de anticorpos específicos no ELISA com antígeno do vírus Andes em 48, positividade de 12%, conforme mostrado na Tabela 5. Da mesma forma, dentre os 430 homens participantes, observamos a presença de anticorpos específicos em 69, positividade de 16,4%. Não houve significância estatística para a diferença de positividade para *Hantavirus* observada nos homens e nas mulheres ($p = 0,0892$).

Tabela 5: Positividade para *Hantavirus* segundo o sexo.

Sexo	Positivos/participantes	Positividade
Masculino	69/430	16,4%
Feminino	48/398	12,0%

4.2.4. Positividade segundo a faixa etária

A positividade para *Hantavirus* segundo faixa etária dos participantes do inquérito sorológico encontra-se na Tabela 6 e na Figura 15.

Tabela 6: Positividade para *Hantavirus* segundo a faixa etária.

Faixa etária	Positivos / participantes	Positividade %
15-20	18/123	14,6
21-30	19/228	8,3
31-40	36/200	18,0
41-50	29/169	17,2
51-60	13/75	17,3
61-70	2/23	8,7
TOTAL	117/818	14,3

Figura 15. Participantes e positividade segundo faixa etária dos participantes do inquérito sorológico para *Hantavirus* em Jardinópolis.

Comparando a positividade para *Hantavirus* em cada uma das faixas etárias com as demais, observou-se significativamente diminuída na faixa etária de 21 a 30 anos ($p=0,0117$) e aumentada de 31 a 40 anos ($p=0,0036$).

4.2.5. Positividade segundo o local de atividade profissional

A positividade para infecção por *Hantavirus* segundo o local de atividade dos participantes do inquérito sorológico foi compilada na Tabela 7.

Tabela 7 - Positividade para *Hantavirus* segundo o local de atividade profissional.

Local de atividade	Positivos/ Participantes	Positividade %
Urbana	83/533	15,6
Rural	16/98	16,32
Ignorada	18/187	9,62

Não se observou diferença significativa entre a positividade para *Hantavirus* nos indivíduos com atividade profissional urbana e rural ($p=0,8799$). O grupo com local de atividade ignorada não foi analisado.

Também, analisou-se a positividade para *Hantavirus* em participantes com atividade em domicílio (210 do lar e 21 trabalhadores domésticos, positividade de 13%) comparando-a com aqueles referindo outras atividades urbanas (302 participantes com positividade de 17,5%). Não se observou associação entre atividade no domicílio com positividade para *Hantavirus* ($p=0,1847$).

4.2.6. Positividade segundo o contato com roedores

Nestes participantes do inquérito sorológico para *Hantavirus*, 367 referiram contato com roedores e, destes, 56 apresentavam anticorpos para *Hantavirus*, positividade de 15%. Dentre os que não referiram este contato, 451, 61 apresentavam anticorpos para *Hantavirus*, positividade 13,5%. Estes resultados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8- Positividade para *Hantavirus* segundo referência a contato com roedores.

	Positivos/Participantes	Positividade %
Contato com roedores	56/367	15,2
Ausência de contato	61/451	13,5

Não houve associação entre positivities para *Hantavirus* nos indivíduos que declararam contato com roedores ($p= 0,4842$).

4.2.7. Positividade segundo a habitação urbana ou rural

Entre os participantes do inquérito sorológico, a positividade para *Hantavirus* entre os que habitavam zona urbana e zona rural encontra-se mostrada na Tabela 9.

Tabela 9- Positividade para *Hantavirus* segundo a habitação em zona urbana ou rural.

Local de Habitação	Positivos/Participantes	Positividade %
Urbano	111/725	15,31
Rural	06/93	6,45

Mostrou-se significativa a maior positividade para *Hantavirus* observada entre moradores de zona urbana, comparada com aquela dos habitantes rurais ($p=0,0183$).

4.2.8. Positividade segundo o antecedente de pneumonia grave

Dentre os 818 moradores do município de Jardinópolis que participaram do inquérito sorológico para *Hantavirus*, 33 indivíduos (4,34% do total de participantes) referiram pneumonia grave pregressa. Destes, 3 apresentaram anticorpos para *Hantavirus* (9,09%). Não se observou associação de positividade para *Hantavirus* com os indivíduos que referiram pneumonia grave ($p=0,6096$).

4.2.9. Títulos para *Hantavirus* das amostras de sangue dos participantes do inquérito sorológico

As amostras do sangue de 117 participantes do inquérito sorológico que apresentaram anticorpos para *Hantavirus* por ELISA à diluição 1/50, foram novamente testadas, nas diluições 1/100, 1/400 e 1/1600. Destas, 32 apresentaram anticorpos para *Hantavirus* no título de 100 (recíproca da diluição) e 18 no título de 400. Informações sobre os indivíduos que apresentaram anticorpos para *Hantavirus* nos títulos 100 e 400 são mostradas na Tabela 10. Nenhuma amostra na diluição 1/1600 apresentou anticorpos para *Hantavirus*.

Tabela 10 – Informações sobre os participantes que apresentaram anticorpos para *Hantavirus* nos títulos 100 e 400.

Características dos Participantes	Número de positivos e percentual (%) no Título 100	Número de positivos e percentual (%) no Título 400
Homens	20 (62%)	12 (66,6%)
Mulheres	12 (37,5%)	06 (33,3%)
Habitantes Urbanos	31 (97 %)	17 (94,4%)
Habitantes Rurais	01 (3%)	01 (5,5%)
Contato com roedores	09 (28%)	03 (16,6%)
Pneumonia grave pregressa	02 (6,25%)	02 (11,11%)
Total de amostras positivas	32 (27%)	18 (15,38%)

Não houve associação entre títulos, de 100 e 400 para *Hantavirus* com gênero, local de habitação, contato com roedores e pneumonia grave pregressa.

5. Discussão

As hantavirose são prevalentes na Ásia e Europa, causando Febre Hemorrágica com Síndrome Renal. Em 1993, ocorreu o primeiro relato de casos de hantavirose nas Américas, porém, causando enfermidade distinta daquela do velho mundo, a Síndrome Pulmonar e Cardiovascular, doença muito grave e potencialmente letal. As pessoas se infectam através da aspiração de aerossóis contendo dejetos de roedores infectados. Até 2001, 1103 casos desta síndrome foram notificados no Continente Americano (Organização Pan-americana de Saúde, 2002). Seria a SPCVH uma doença nova? Ou esta doença já ocorreria nas Américas e teria sido detectada apenas agora? Será que a doença vem aumentando de incidência nos últimos anos? O que teria influenciado este aumento na incidência? Estas são questões que todos os que estudam as hantavirose fazem com relação à emergência da SPCVH.

Nos Estados Unidos, o aparecimento de casos da SPCVH foi relacionado com possível perturbação ecológica ocorrida na primavera de 1993. Naquele ano, quando houve a ocorrência de chuva e neve em demasia, diferente de outros anos (Le Guenno, 1997), houve conseqüente aumento na produção de grãos e na população de roedores, os quais são hospedeiros primários dos *Hantavirus*. Aumentando a população de roedores silvestres, ocorreu incremento no contato destes roedores com os seres humanos, facilitando a infecção pelos *Hantavirus*.

No Brasil, alguns estudos sorológicos em seres humanos foram realizados antes de 1993, mostrando a ocorrência de infecções por *Hantavirus*; inclusive, sugeriu-se que esta infecção poderia produzir manifestação clínica que se confundia com a da leptospirose (Hindrichsen, 1993). Entretanto, após os 3 primeiros casos de SPCVH ocorridos em 1993 em Jquitiba, SP, até dezembro de 2001, 196 casos da doença foram notificados no país, causando 76 óbitos e letalidade de 38,7% (Ministério da Saúde do Brasil, 2001). A SPCVH ocorreu principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil.

5.1 Estudo de série de casos

Na região Nordeste do Estado de São Paulo, a partir de 1998, ocorreram 55% dos 33 casos notificados neste Estado, mostrando que esta região é predisposta à ocorrência da SPCVH e permitindo-nos confirmar que se trata de doença grave e com alta letalidade. Primeiramente, chamou-nos a atenção tratar-se de uma doença associada ao meio rural, a pessoas que nele

trabalham ou que habitam em suas proximidades (Young, 2000). Também, chamou a atenção a sazonalidade da doença porque, dos 14 casos ocorridos na região até 2001, 12 foram nos meses de abril, maio e junho. Esta sazonalidade poderia estar relacionada à safra da cana de açúcar. Nesta época do ano, grandes partes dos canaviais são queimados, o que poderia afugentar e concentrar roedores silvestres em locais próximos a habitações humanas, bem como poderia eliminar os predadores naturais desses roedores, as cobras. Também, as aves de rapina predadoras migraram para outras regiões com o desmatamento e conseqüente desaparecimento das árvores do cerrado. Ainda, nesta época ocorre a safra de grãos, porém, de acordo com o Instituto Agrônomo de Campinas, o número de sacas de grãos por hectare tem diminuído na região, apesar de estar aumentado no restante do país. Além disso, entre abril e junho, também ocorre na região a safra das sementes de capim *Brachiaria sp*, que é um dos alimentos favoritos dos roedores silvestres e que poderia atrair, alimentar e assim aumentar a população desses animais, particularmente do *Bolomys laziurus*, que se acredita ser o principal reservatório de *Hantavirus* em nosso meio (Pereira et al., 1998).

Os 14 pacientes com SPCVH que estudamos mostraram uma doença aguda grave, que nos primeiros dias não causa sintomas respiratórios, manifestando-se, principalmente, por febre alta, mialgias e cefaléia. Este período prodrômico teve duração de até 7 dias. Nesta fase, a SPCVH poderia ser confundida com outras doenças virais como a dengue. Por outro lado, seria importante fazer a suspeita clínica de SPCVH ainda nesta fase, o mais precocemente possível, do que dependeriam melhores resultados com o tratamento. Nossos achados clínicos são similares aos observados na epidemia ocorrida no Novo México, USA, onde 17 pacientes apresentaram os sintomas prodrômicos de febre (95%), mialgias, principalmente na região das coxas, além de calafrios, cefaléia, conjuntivite e sintomas gastrointestinais (Duchin et al., 1994). Em nossos pacientes, observamos febre em todos os casos. Não encontramos conjuntivite em nossos pacientes e mialgias foram observadas em apenas 3 casos (21%). Também, nesses pacientes, após o terceiro dia de doença, surgiu tosse seca e dispnéia, prenunciando grave pneumonia intersticial e insuficiência respiratória. Complicou os quadros o choque cardiogênico que surgiu, concomitante à insuficiência respiratória. Não observamos arritmia cardíaca, de forma isolada, diferente do relatado em 1994 por Duchin e Koster, que encontraram caso de taquicardia ventricular nos Estados Unidos. Como já referimos anteriormente, trata-se de quadro de choque do tipo misto, ou seja, com componente

cardiogênico e de componente circulatório, devido ao extravasamento nos capilares pulmonares, causando hemoconcentração e plaquetopenia (Hallin et al., 1996).

Os achados laboratoriais em nossos pacientes com SPCVH também foram similares aos relatados nos Estados Unidos (Duchin & Koster, 1994). Observamos elevação do hematócrito em todos os casos, exceto uma paciente, que tinha como antecedente anemia crônica e hipotireoidismo. Nos Estados Unidos, a elevação do hematócrito foi observada em 76 % dos casos (Duchin & Koster, 1994). Nos 10 pacientes em que pudemos avaliar a contagem de plaquetas no sangue, esta se mostrou diminuída, abaixo de 130000 plq/mm³, em todos os casos, enquanto que nos Estados Unidos, foi observada plaquetopenia em 71% (Simonsen et al., 1995).

Quanto à função renal, observamos elevação nos teores de creatinina sérica em 63,6% dos casos. Esta elevação ficou em torno de 2,0 a 2,5 mg/dl. Apenas um de nossos casos apresentou elevação importante da creatininemia (> 5 mg/dl) e nenhum necessitou processo dialítico. Também não foi indicada diálise em casos ocorridos nos Estados Unidos. Na América do Sul, Chile e Argentina foram relatados casos de SPCVH com freqüente comprometimento renal (Enria, 2001) e elevação proeminente da creatinina em 53% dos casos (Lazaro, 2000; Castillo, 2001).

Em nossos casos, a avaliação radiológica do tórax em período prodrômico evidenciou leve infiltrado intersticial bilateral que evoluía em 24 horas, concomitante à insuficiência respiratória, com extensão, intensificação e finalmente surgia condensação bilateral, quadro semelhante ao da Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA). Trabalho realizado no Canadá, analisando exames radiológicos do tórax de 20 pacientes, divide o quadro radiológico da SPCVH em formas limitada e fulminante. A forma limitada assemelha-se ao quadro radiológico que observamos em nossos pacientes no período prodrômico. A forma fulminante associou-se ao óbito em 46% dos casos e provavelmente corresponde às formas com condensação bilateral, quadro semelhante a SARA (Boroja et al., 2002). Entretanto, é possível que os quadros radiológicos descritos como limitados, como em nossos casos em fase prodrômica, possam evoluir para exames mostrando quadros fulminantes.

Os achados clínicos, laboratoriais e radiológicos, observados nos 14 pacientes com SPCVH da região de Ribeirão Preto, foram semelhantes aos descritos em outras regiões do Brasil (Ferreira, 2000; Mendes, 2001; Furtado & Muller, 2001).

Sendo a SPCVH doença de descrição recente e emergente na região de Ribeirão Preto, a partir de 1998, os médicos locais, em sua maioria, desconhecem os quadros clínico, laboratorial e radiológico

que fazem suspeitar desta síndrome. Assim, com base nos dados obtidos dos casos de SPCVH que estudamos, foi um de nossos objetivos orientar as equipes de saúde, visando a que fosse possível fazer suspeita clínica da doença, utilizando a anamnese, exame físico e exames complementares de prática comum em nosso meio. O fluxograma que elaboramos (Figura 14) objetiva facilitar o diagnóstico clínico da SPCVH. Leva em conta a possibilidade de ocorrência da SPCVH em indivíduos previamente hígidos, trabalhando em contato com o meio rural (não necessariamente em todos os casos) e apresentando doença caracterizada por febre, mialgias e que evolui com tosse e insuficiência respiratória. Nesses casos, orientamos que seja feito, imediatamente, exame radiológico de tórax, que costuma estar mais disponível em nossas unidades de saúde, quando comparado ao hemograma, incluindo hematócrito e contagem de plaquetas no sangue. De maneira distinta, a determinação do hematócrito, contagem de plaquetas e pesquisa de linfócitos atípicos (imunoblastos) no sangue são preconizados como primeiros exames a serem realizados para o diagnóstico clínico da SPCVH na América do Norte (Duchin & Koster, 1994). Portanto, voltando ao exame radiológico, escolhido como exame inicial em nosso fluxograma, quando este mostrar infiltrado pulmonar intersticial bilateral ou velamento alveolar bilateral, recomendamos que seja feito hematócrito e contagem de plaquetas no sangue. Havendo hemoconcentração (hematócrito $\geq 50\%$) e plaquetopenia ($<130000/\text{mm}^3$ de sangue), faz-se a suspeita clínica de SPCVH. Evidentemente, este diagnóstico deverá ser confirmado posteriormente em laboratório de virologia por método sorológico ou RT-PCR, mas as condutas de monitoramento hemodinâmico e da função respiratória, bem como as medidas terapêuticas de suporte ventilatório, restrição na hidratação e controle da pressão arterial com aminas vasoativas devem ser tomadas imediatamente. Fazem diagnóstico diferencial com a SPCVH as infecções virais, como a Influenza, as pneumonias atípicas por micoplasma, legionelose, leptospirose, febre Q, tularemia, peste septicêmica, histoplasmoses e, nos pacientes imunocomprometidos, a pneumonia por *Pneumocystis carinii*, citomegalovírus, *Cryptococcus*, *Aspergillus* (Hallin et al., 1996). A presença de hemoconcentração e de plaquetopenia permitem que estas outras hipóteses diagnósticas sejam afastadas. Em nosso meio, a pneumonia por *Pneumocystis carinii* como primeira manifestação da AIDS e do dengue hemorrágico, em casos com derrame pleural, mostram-se como importantes doenças para o diagnóstico diferencial com SPCVH. Sabendo-se que o quadro de choque e o de insuficiência respiratória na SPCVH podem instalar-se, ou tornar-se irreversíveis em questão de horas, para reduzir a letalidade destes pacientes é importante que eles sejam atendidos em local com recursos de terapia intensiva e que, no máximo,

em 12 horas sejam iniciadas medidas terapêuticas de suporte. Trata-se de decisão crítica para a vida do paciente (Figueiredo et al., 2001; Furtado & Muller, 2001). Observamos que dentre os 8 casos fatais que estudamos, em 5 o diagnóstico foi suscitado apenas à necropsia. Quanto aos sobreviventes, em todos os casos, a suspeita diagnóstica de SPCVH foi feita entre o 1º e o 2º dia de internação. Esta diferença mostrou-se significativa ($p=0,0152$). Portanto, na maioria de nossos casos fatais não se suspeitou da SPCVH e, provavelmente, isto fez com que as medidas terapêuticas sugeridas fossem postergadas. Observamos que as recomendações para tratamento da SPCVH, com base nos surtos ocorridos nas Américas, foram aplicadas, de forma parcial ou total, na maior parte dos tratamentos de pacientes analisados no presente estudo (Duchin & Koster, 1994). Essas incluem cuidados precoces de terapia intensiva, monitoração cuidadosa da oxigenação, da pressão arterial e ventilação mecânica precoce (Gravilovskaya et al., 1998; Kuno et al., 1996). Em nossos casos, a oxigenação para tratamento da insuficiência respiratória, utilizando ventilação mecânica, ocorreu no primeiro dia de internação e não teve associação com sobrevida, assim como o uso de aminas vasoativas e o de corticosteróides. Alguns clínicos preconizam o uso de corticosteróides em altas doses como benéfico para tratamento do extravasamento capilar em casos de SPCVH com grave insuficiência respiratória. Entretanto, trata-se de conduta sem estudo científico comprobatório (Amoura et al., 1997; Peters et al., 2002). Quanto ao uso de corticosteróides, também não observamos diferença significativa, sendo que tanto sobreviventes como casos fatais utilizaram a droga. A prevenção da instalação do quadro de choque através do uso precoce de aminas vasoativas, ainda quando o paciente é atendido na unidade de atendimento primário, tem sido recomendado pela Secretaria da Saúde do Estado do Paraná, como importante para melhora do prognóstico nos casos de SPCVH (Furtado & Muller, 2001). Em nossos casos, não houve correlação significativa entre ocorrência de choque e letalidade porque 50% dos nossos pacientes evoluíram para quadro de choque grave que, bem conduzido, reverteu-se com a utilização de aminas vasoativas. Quanto ao balanço de fluidos, este juntamente com a restrição hídrica, é enfaticamente recomendado nos pacientes com SPCVH e que, portanto, têm extravasamento de líquidos em leito vascular pulmonar. Nestes pacientes, o líquido infundido tende a concentrar-se no pulmão, agravando, ainda mais, a insuficiência respiratória (Peters et al., 2002). Nossos achados corroboram a necessidade da restrição hídrica como medida terapêutica na SPCVH. Analisando a hidratação parenteral a que foram submetidos 10 dos 14 pacientes com SPCVH, observamos associação significativa ($p=0,0152$) entre

infusão de líquidos EV igual ou superior a 2500 ml nas primeiras 24h de tratamento hospitalar e evolução para o óbito.

No tratamento dos casos por nós observados, não se utilizou a droga antiviral ribavirina, que, de acordo com dados da literatura, tem ação *in vitro* sobre os *Hantavirus* americanos e tem sido utilizada com redução da mortalidade em 7 vezes, em casos de febre hemorrágica com síndrome renal, na Ásia (Huggins et al., 1991; Morrison et al., 1995). A droga tem sido preconizada na dose de 1g a cada 6 horas por 4 dias, seguida de 1g a cada 8 horas por 3 dias e pode ser utilizada também no tratamento de casos de SPCVH. Entretanto, estudo efetuado não mostrou benefício clínico da droga, provavelmente porque esta leva 4 dias para atuar e, na SPCVH, a doença grave já se encontra instalada após este tempo (Chapman et al., 2002; Hallin et al., 1996; Peters et al., 2002). A observação de que 4 dentre 5 sobreviventes fizeram uso de Claritromicina, o que ocorreu apenas com 1 dos 6 casos fatais. Esta diferença não se mostrou significativa ($p=0,0801$). Ademais, sendo esta uma pequena casuística e desconhecendo-se qualquer atividade antiviral da Claritromicina, é provável que esta observação seja apenas uma coincidência.

A avaliação médica tardia dos casos de SPVCH tem mostrado seqüelas que causam fadiga e restrição da função pulmonar, com repercussões na forma de vida de mais de 30% dos pacientes na América do Norte (Goade et al., 2001). Em nosso estudo, entre os 6 pacientes que sobreviveram à SPCVH, compareceram às consultas de reavaliação somente 2, que haviam tido SPCVH há 30 meses. Estes pacientes não referiram qualquer queixa após a alta hospitalar. O exame clínico não evidenciou nenhuma alteração patológica e os resultados dos exames laboratoriais mostraram-se dentro dos limites da normalidade. As tomografias de tórax de ambos os pacientes foram normais. Testes de função pulmonar foram realizados apenas em um caso, mostrando-se dentro dos limites da normalidade. Entretanto, trata-se de casuística pequena e que não permite tirar conclusões sobre a ocorrência de seqüelas na SPCVH que ocorre no Brasil.

5.2. Inquérito sorológico

A ocorrência dos 14 casos graves de SPCVH na região de Ribeirão Preto entre 1998 e 2001 levou a conjecturas sobre como seria a epidemiologia desta virose e sobre a possibilidade da ocorrência de infecções por *Hantavirus*, causando quadros mais benignos ou mesmo infecções inaparentes. Por isso, nosso laboratório realizou um estudo preliminar na região, com amostras séricas obtidas de indivíduos submetidos a exames de rotina em unidades de saúde em Ribeirão

Preto e nos municípios vizinhos de Guariba e Jardinópolis. Estas amostras foram analisadas por ELISA contra antígenos do *Hantavirus* Sin Nombre e encontrou-se uma positividade de 1,23%. Este trabalho mostrou que infecções por *Hantavirus* não são raras na região de Ribeirão Preto e que a positividade de 1,23% foi superior à observada na América do Norte em estudos feitos com populações de risco por contato com roedores (Holmes et al., 2000). Também neste estudo, observou-se uma positividade de infecções pregressas por *Hantavirus* significativamente mais elevada (4,5%) em Jardinópolis. Decidimos aprofundar o estudo soro-epidemiológico na região, determinando níveis de anticorpos para *Hantavirus* e relacionando estes níveis com dados referidos pelos participantes do inquérito, tais como idade, sexo, antecedentes mórbidos e profissionais, local de habitação, tipo de moradia, número de moradores na casa, coleta de lixo, esgoto encanado, contato com roedores e presença de celeiro ou cômodo para guardar cereais nas proximidades da casa (Iversson et al., 1994; Travassos da Rosa et al., 1994; Williams et al., 2002; Mascarenhas-Batista, 1998; Romano, 1996). Para tanto, escolhemos o município de Jardinópolis, tendo contado com a colaboração da Secretaria Municipal de Saúde. Também ocorreu em Jardinópolis um caso fatal de SPCVH, em 1999, que foi por nós estudado.

O estudo soro-epidemiológico foi cuidadosamente planejado. A população de 15 a 70 anos foi selecionada para o estudo. A preferência por esta faixa etária deveu-se ao conhecimento prévio de que a SPCVH acomete principalmente adultos em fase de plenitude física e de trabalho. A população de Jardinópolis com 15 a 70 anos, 20.865 habitantes, foi representada de forma aleatória, da qual participaram todas as quadras da cidade que não se enquadravam nos critérios de exclusão. Entretanto, reconhecemos que a retirada de algumas quadras do estudo, por possuírem número muito pequeno de casas e também o fato de termos escolhido para participação apenas propriedades rurais com maior número de habitantes, poderiam ter prejudicado o nosso processo de amostragem no sentido de que não fosse completamente aleatório. Justificamos estes procedimentos como decisões tomadas em campo e que, na ocasião, facilitaram a operacionalidade do inquérito sorológico.

Com base em nossa revisão bibliográfica, observamos que se trata de inquérito sorológico para *Hantavirus* realizado com amostragem aleatória da população de um município inteiro. Uma revisão de 14 inquéritos para *Hantavirus* no Continente Americano mostrou que todos utilizaram amostragens dirigidas para casos suspeitos, populações supostamente de risco, sendo que um deles foi realizado em ambiente escolar (Iversson et al., 1994; Vasconcelos et al., 1997; Ferrer et al., 2001;

Holmes et al., 2000; Williams et al., 1997; Mascarenhas-Batista, 1998; Hindrichsen et al., 1993; Torres-Morales, 1999; Padula et al., 2000; Flores-Leon & Morales-Jimenez, 2001; Romano, 1996; Sosa et al., 2000). Também, nosso estudo diferenciou-se por realizar as coletas de sangue em papel de filtro, através de digitopuntura, o que aumentou a receptividade da população. Para tanto, consideramos o relato feito em 1996 por Romano, que referiu em seu inquérito sorológico, realizado na região do Vale do Ribeira, SP, dificuldade na participação de indivíduos devido ao temor natural em doar sangue por venopunção.

A metodologia que escolhemos para teste das amostras de sangue coletadas foi a de ELISA, com detecção de anticorpos IgG utilizando antígeno N recombinante do vírus argentino Andes, o qual mostrou-se, em análises filogenéticas, proximamente relacionado ao *Hantavirus* Araraquara, detectado perto da região de Ribeirão Preto (Johnson et al., 1999). Também, como em nosso estudo, na maioria dos inquéritos sorológicos para *Hantavirus* realizados no Continente Americano, utilizou-se o método de ELISA para detecção de anticorpos IgG, entretanto utilizando, na grande maioria, antígenos do vírus norte-americano Sin Nombre (Vasconcelos et al., 1997; Romano, 1996; Souza et al., 2001; Ferrer et al., 2001; Holmes et al., 2000; Williams et al., 1997; Mascarenhas-Batista, 1998; Torres-Morales 1999). Acreditamos que o uso do antígeno de um *Hantavirus* sul-americano no teste utilizado em nosso inquérito aumentaria sua sensibilidade. Realizamos uma adequada padronização do método de ELISA, que se mostrou reprodutível e confiável. A reprodutibilidade do teste foi claramente evidenciada pela repetição e confirmação, por 3 vezes ou mais, dos soros positivos.

O tamanho da amostra efetivamente obtida, 818 indivíduos, permitiu uma representatividade confiável para a população do município de Jardinópolis. Dentre os 818 participantes do inquérito sorológico, a positividade foi de 14,3%, ou seja, 117 participantes apresentavam anticorpos IgG para *Hantavirus* Andes. Extrapolando esta informação para a população com 15 a 70 anos, 2983 habitantes do município de Jardinópolis teriam se infectado com *Hantavirus*. Esta positividade foi surpreendentemente elevada. Utilizando ELISA similar, com antígeno do vírus Andes, inquérito realizado no México por Flores et al., 2000, em 326 pacientes com leptospirose, dengue e influenza, mostraram positividade muito inferior à que observamos, 1,22%, sugerindo apenas a ocorrência de infecções por estes vírus no México. Positividades altas para *Hantavirus*, semelhantes à que observamos, foram descritas apenas em dois inquéritos realizados na região oeste do Paraguai, em planície semi-árida e pouco povoada (Gran Chaco), utilizando ELISA com antígeno do vírus Sin

Nombre e analisando 405 amostras de 24 casos suspeitos de hantavirose, 27 contactantes desses pacientes e 354 membros da mesma comunidade (Williams et al., 1997). Nesse último estudo, observou-se 14,8% e 14,2% de positividade entre os contactantes de casos suspeitos e os da comunidade. O outro estudo, realizado por Ferrer em 1998 na mesma região, analisou com ELISA e antígeno do vírus Sin Nombre soros de 356 indígenas, 140 descendentes de germânicos e 20 hispânicos, observando positivities de 52%, 36% e 24% respectivamente. Essa região paraguaia, onde ocorreram 50 casos de SPCVH, revelou a mais alta prevalência de infecções por *Hantavirus* nas Américas. Explicações para as altas positivities não foram apontadas pelos autores, que lembram, apenas, o fato de serem as infecções provavelmente causadas pelo vírus Laguna Negra e cursarem com um menor número de casos da SPCVH do que o observado na América do Norte pelo vírus Sin Nombre.

Nosso inquérito sorológico mostrou a mais alta prevalência de infecções por *Hantavirus* americano dentre os estudos brasileiros. Romano, 1996, estudando por ELISA com antígenos de Sin Nombre, a população rurícola do Vale do Ribeira, SP, observou positividade de 1,6%. Soros de 523 pacientes com quadro sugestivo de leptospirose, 58 contactantes desses pacientes, 289 portuários, 62 trabalhadores da Superintendência do Desenvolvimento do Litoral Paulista (SUDELPA), 39 pescadores, 25 militares e 67 ilhéus provenientes de São Paulo, Capital, e do Vale do Ribeira foram estudados utilizando testes de imunofluorescência indireta e neutralização para os vírus Hantaan, Seoul e Puumala, observando-se positivities mais elevadas, 12,8% entre pescadores, 8% nos trabalhadores da SUDELPA e 7,4% nos ilhéus (Iversson et al., 1994). Entre 1993 e 2000, o Instituto Adolpho Lutz testou por ELISA com antígenos do vírus Sin Nombre, 1495 soros de casos suspeitos da SPCVH oriundos de todo o Brasil, com positividade de 5,36% (Pereira, 1998, Vasconcelos et al., 1997; Souza et al., 2000). Estudando por ELISA com antígenos de vírus Sin Nombre 49 contactantes de pacientes com SPCVH, observou positividade de 8,16%. Em Salvador, BA, inquérito realizado em 379 escolares analisado por ELISA com antígenos de vírus Sin Nombre e imunofluorescência para vírus Hantaan, observou-se 13,2 % de positividade para vírus Hantaan e ausência de positivos para vírus Sin Nombre (Mascarenhas-Batista, 1998). Também na cidade de Salvador, BA, outro inquérito, do qual participaram 255 trabalhadores de limpeza pública e 241 doadores de sangue, foi efetuado através de imunofluorescência indireta para vírus Hantaan e ELISA para vírus Sin Nombre, tendo sido observada positividade de apenas 0,2%, para vírus Sin Nombre e somente entre os doadores de sangue. A positividade entre os trabalhadores da limpeza

pública foi de 0% para Sin Nombre. Por outro lado, observou-se positividade de 27% para vírus Hantaan nos 3 grupos estudados. O autor sugere, nesse trabalho, a existência de infecções humanas por *Hantavirus* correlacionadas a baixo nível socioeconômico (Torres-Morales 1999). Em Recife, PE, Hindrichsen estudou em 1993, por teste de imunofluorescência indireta para vírus Hantaan, 144 amostras do sangue de pacientes com suspeita de leptospirose, observando que 5,1% apresentavam anticorpos, incluindo 1,3% que tinham aqueles do tipo IgM. Os inquéritos sorológicos realizados em 1994 por Iversson et al., efetuados no nordeste brasileiro, sugerem que diferentes *Hantavirus* poderiam causar infecção humana no Brasil, inclusive podendo ocorrer infecções por vírus do velho mundo associados a roedores urbanos. Também, o quadro clínico conseqüente a estas infecções poderia ser discreto ou distinto, com menor acometimento pulmonar.

Não observamos diferença significativa de positividade para *Hantavirus* entre homens e mulheres participantes do inquérito sorológico em Jardinópolis. A comparação de nossos resultados com outros inquéritos sorológicos foi prejudicada porque esses estudos foram feitos principalmente com indivíduos do sexo masculino (Iversson et al., 1994; Romano, 1996; Ferrer et al., 2001; Torres-Morales, 1999). Apenas no estudo de Batista Mascarenhas, 1998, foi feita comparação das positivities observadas em ambos os sexos, também sem diferença significativa. A semelhante frequência de infecções por *Hantavirus* em homens e mulheres não corrobora a hipótese mais aceita, de que as infecções por estes vírus ocorram no ambiente de trabalho no campo.

Em relação à positividade para *Hantavirus* segundo a faixa etária dos participantes, positivities significantemente diminuídas foram observadas na faixa de 21 a 30 anos e aumentadas na de 31 a 40 anos. Tal fato é importante, porque esta faixa compreende à idade mais produtiva do ser humano e, coincidentemente, aquela na qual ocorre o maior número de casos fatais da SPCVH. Também Torres-Morales, 1999 observou maiores positivities nas mesmas faixas etárias. Ainda, a prevalência mais elevada nesta faixa etária, coincide com aquelas observadas no Paraguai e na América do Norte (Williams et al., 1997). A maior frequência de infecções por *Hantavirus* na faixa etária de 31 a 40 anos sugere que estas possam ocorrer no local de trabalho, concordando com o observado por outros autores (Young et al., 2000) e com os casos de SPCVCH observados na região.

Ao contrário do esperado, não se observou diferença significativa entre positividade das infecções por *Hantavirus* nos indivíduos com atividade profissional urbana ou rural. Também, ao compararmos a positividade das infecções por *Hantavirus* em participantes com atividade no

domicílio e aqueles referindo outras atividades urbanas, observamos uma diferença de 13 para 17,5%, a qual, entretanto, não foi significativa. Portanto, nosso estudo não permitiu detectar os locais da infecção por *Hantavirus* e, assim, nossos dados sugerem que, tanto na cidade como no campo, parecem ocorrer estas infecções. Positividades menores, porém semelhantes quanto à frequência, em indivíduos com atividade urbana e rural, foram observadas por outros autores brasileiros (Iversson et al., 1994; Romano, 1996; Torres-Morales, 1999).

Dentre os participantes do inquérito sorológico, que não referiram contato com roedores, 13,5% apresentavam anticorpos para *Hantavirus* e não houve, portanto, associação entre estas infecções com a declaração de contato com roedores possivelmente infectados. Entretanto, este contato poderia estar ocorrendo, sem que o indivíduo tomasse consciência. Em estudo realizado no Vale do Ribeira, SP, observou-se positividade baixa de infecções por *Hantavirus* nos que relataram contato com roedores (Romano, 1996). A autora concluiu que esta positividade baixa dever-se-ia à pequena população de roedores infectados. Também, outros pesquisadores analisaram esta possibilidade, porém sem conclusões definitivas (Iversson et al., 1994; Romano, 1996; Mascarenhas-Batista, 1998; Torres-Morales, 1999).

O fato de não ter havido diferença significativa entre as prevalências de infecções por *Hantavirus*, nos indivíduos que declararam contato com roedores e naqueles que não a declararam, corrobora a suspeita de que os dois grupos estariam expostos ao mesmo fator de risco e que este ocorre de maneira fortuita e despercebida. A positividade de 0,4% para Sin Nombre, encontrada entre os doadores de sangue, e nenhum soro positivo entre os garis, no inquérito sorológico realizado em Salvador por Torres-Morales, em 1999, também leva a suposição semelhante.

Em 2000, Young et al. observaram que a infecção dos pacientes com SPCVH se dá, na metade dos casos, perto do local de habitação, 10% no local de trabalho e 5% em sítios relacionados à recreação. Contra o esperado, ao analisarmos o local de habitação, a positividade das infecções por *Hantavirus* entre os que moravam na zona urbana mostrou-se significativamente maior do que a observada entre moradores de zona rural. Não temos explicação para este fato. Entretanto, todas as habitações que visitamos, mesmo na zona rural, eram de alvenaria, possuíam coleta de lixo, esgoto encanado e nenhum participante referiu a existência de celeiro ou cômodo para guardar cereais próximos à casa, o que poderia reduzir o número de roedores nessas moradias e sugerir outro local de infecção, distinto do domicílio.

Nos casos de SPCVH ocorridos na região de Ribeirão Preto, observamos que profissão e local de moradia estariam associados à doença. Esperaríamos que os resultados deste inquérito sorológico apresentassem diferença significativa entre habitação rural e urbana, ou melhor, que a prevalência de infecções por *Hantavirus* fosse significativamente maior nos habitantes da zona rural. Entretanto, nossos resultados não corroboraram o observado para os pacientes com SPCVH. Para explicar o fato, supomos que exista uma grande integração entre rural e urbano em municípios como o de Jardinópolis. Atualmente, é muito fácil, com boas estradas, a locomoção de trabalhadores rurais, que moram na cidade e trabalham diariamente no campo. Também, com o êxodo rural que vem ocorrendo gradativamente há anos, muitas das infecções observadas em meio urbano, poderiam ter ocorrido quando estes indivíduos habitavam a zona rural. Ainda, observa-se que, com o crescimento, estas cidades estão *invadindo* o campo através de conjuntos habitacionais. Finalmente, são importantes para a infecção por *Hantavirus* as visitas comuns destes indivíduos *urbanos* a moradias rurais em finais de semana para atividades de lazer, como a pesca (Peters et al., 2002; Young et al., 2000).

Quanto à história pregressa de pneumonia grave, observamos não haver associação desta ocorrência com a infecção por *Hantavirus*. Tal fato mostra que as infecções por *Hantavirus* ocorridas nos pacientes teriam causado, na maioria, manifestações inaparentes, subclínicas, ou clínicas de evolução benigna e autolimitadas. Nestes casos, a hantavirose seria, provavelmente, diagnosticada como virose inespecífica sem manifestação cárdio-pulmonar. Tal hipótese merece ser verificada em pesquisas futuras, buscando encontrar casos menos graves da doença por *Hantavirus*.

Em estudos de seguimento de casos com SPCVH realizados na América do Sul, observou-se níveis de IgG específicos para *Hantavirus* que se elevam a partir do terceiro dia do início dos sintomas e permanecem elevados por longo tempo, que supera 4 anos (Padula et al., 2000). Em nosso estudo, não observamos associação entre relato de pneumonia pregressa e elevados títulos séricos de IgG para vírus Andes, da ordem de 400. Também, não observamos nenhuma característica que nos chamasse a atenção nestes participantes com altos títulos séricos, seja o contato com roedores, idade, atividade profissional ou local de habitação. É possível que, nesses casos, a infecção tenha ocorrido em data mais recente.

Inquéritos sorológicos realizados por outros autores tomaram amostras populacionais, dentro de populações de risco ou ligadas à atividade em contato com roedores silvestres ou também em populações de escolares em bairros de periferia. Estas populações de estudo poderiam levar a um

erro sistemático e não abranger o maior contingente de indivíduos infectados por *Hantavirus*, porque, nesses estudos, os resultados, como no nosso, foram diferentes do que se esperava com base nas informações epidemiológicas obtidas dos casos de SPCVH (Iversson et al., 1994; Williams et al., 1997; Mascarenhas-Batista, 1998). Aliás, em 1999, no estudo de Torres-Morales, o nível de soropositivos entre os indivíduos controles por suposto baixo risco foi maior do que na população supostamente de risco.

Em suma, o inquérito sorológico feito no município de Jardinópolis, mostrou que infecções por *Hantavirus* são comuns, especialmente entre os adultos em idade produtiva e independem do sexo, da profissão e da referência ao contato com roedores. Por outro lado, foram mais frequentes os soropositivos nos moradores urbanos, apesar deste dado não poder ser relevado de maneira absoluta, devido à intensa interação que existe entre o urbano e o rural naquela localidade. Não foi possível determinar com clareza o local provável de infecção por *Hantavirus* nos moradores de Jardinópolis. Também, nossos achados não corroboram os dados epidemiológicos observados nos casos que apresentaram doença grave na região de Ribeirão Preto e que apontavam a importância do contato com o meio rural e presença de roedores no local de trabalho. Por outro lado, a utilização de uma coleta de dados sucinta, apesar de ter facilitado o trabalho de campo, pode ser considerada uma deficiência neste inquérito sorológico, pois nela faltaram informações dos participantes quanto à vida pregressa, seus locais de habitação e atividades profissionais anteriores. Portanto, com base no referido acima, elaboramos algumas hipóteses ou questões que necessitariam verificação em estudos futuros:

Circulariam entre os roedores e causariam infecções em seres humanos na região de Ribeirão Preto mais de um *Hantavirus*? Seriam estes distintos *Hantavirus* causadores de doenças clínicas diferentes, sendo a maioria delas de baixa gravidade?

Haveria roedores silvestres adaptados à vida urbana na região, transmitindo *Hantavirus* para o homem neste meio?

Estariam roedores *Murinae* (originários do velho mundo) infectados por *Hantavirus* e transmitindo estes agentes para os seres humanos no meio urbano?

Ou, vendo a questão por outro ângulo:

Haveria infecções humanas por apenas um *Hantavirus* na região, porém, a maior gravidade destas infecções, causando SPCVH numa minoria de casos, dever-se-ia a fatores genéticos predisponentes do hospedeiro, que estariam associados à intensidade da resposta imune?

Estaria a gravidade da doença associada à quantidade de partículas de *Hantavirus* inaladas no momento da infecção?

6. Conclusões

Os 14 pacientes com hantavirose apresentaram doença aguda grave que acomete extensamente ambos os pulmões, causando insuficiência respiratória e também o sistema cardiovascular, levando ao choque. Trata-se da Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por *Hantavirus*, com letalidade de 57,14%.

Os 14 pacientes com Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por *Hantavirus* tinham, em sua maioria, contato com o meio rural.

Dos 14 pacientes com Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por *Hantavirus* em que estes exames foram realizados, todos, com exceção de apenas um caso, apresentaram elevação do hematócrito e plaquetopenia, o que ressalta a importância da utilização destes exames para o diagnóstico.

Nos 14 pacientes com Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por *Hantavirus*, o exame radiológico de tórax mostrou-se útil para a suspeita da doença, por evidenciar acometimento pulmonar bilateral sugestivo.

Dentre os 8 casos fatais da Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por *Hantavirus*, em 5 o diagnóstico foi suscitado apenas à necropsia e em todos os 6 sobreviventes a suspeita diagnóstica foi feita entre o 1º e o 2º dia de internação, ressaltando a importância da suspeita clínica na sobrevivência destes pacientes.

O volume da hidratação parenteral a que foram submetidos 10 dos 14 pacientes com Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por *Hantavirus* nas primeiras 24 horas de internação, quando superior a 2500 ml, associou-se à alta letalidade.

A metodologia de ELISA, detectando anticorpos IgG contra antígeno N recombinante do vírus Andes, utilizada no inquérito sorológico, mostrou-se confiável, sensível e reprodutível. O inquérito sorológico realizado em indivíduos de 15 a 70 anos do município de Jardinópolis contou com 818 participantes e, destes, 117 (14,3%) apresentaram evidência de infecção pregressa por *Hantavirus*.

Dentre os participantes do inquérito sorológico para *Hantavirus* no município de Jardinópolis, observou-se prevalência de anticorpos específicos, nos indivíduos com idade entre 31 e 40 anos e nos habitantes da área urbana.

Dentre os participantes do inquérito sorológico para *Hantavirus* no município de Jardinópolis, não se observou associação entre presença de anticorpos específicos com sexo, atividade profissional, referência a contato com roedores e história pregressa de pneumonia grave.

A presença de indivíduos que apresentaram infecção pregressa sem Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por *Hantavirus* é comum no município de Jardinópolis.

7. Referências Bibliográficas

AMOURA, Z.; PAPO, T.; NINET, J.; HALTRO, P. Y.; GUILLAUMIE, J.; PIETTE, A. M.; BLETRY, O.; DEQUIEDT, P.; TLASCZKA, A.; RONDEAU, E.; DUTEL, J. L.; WECHSLER, B.; PIETTE, J. C.. Systemic capillary leak syndrome report on 13 patients with special focus on course and treatment. *Am.J.Med.* v103, p514-9. 1997.

BOROJA, M.; BARRIE, J. R.; RAYMOND, G. S. Radiographic findings in 20 patients with hantavirus pulmonary syndrome correlated with clinical outcome. *AJR Am J Roentgenol.* v178(1), p159-63. jan 2002.

CANTONI, G.; LAZARO, M.; RESA, A.; ARELLANO, O.; AMESTOY, A. M.; DE BUNDER, S.; HERRERO, E.; PEREZ, A.; LARRIEU, E. Hantavirus Pulmonary Syndrome in The Province of Rio Negro, Argentina, 1993-1996. *Rev.Inst.Med.Trop São Paulo.* v39(4), p191-6. 1997.

CASTILLO, C.; NARANJO, J.; SEPULVEDA, A.; OSSA, G.; LEVY, H. Hantavirus pulmonary syndrome due to Andes virus in Tenuco- Chile, clinical experience with 16 adults..*Chest.* v120(2), p548-54. aug2001.

CDC Centers for Disease Control and Prevention. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.* 3rd-ed, Washington USA. p 177. 1993.

CDC Centers for Disease Control and Prevention. Hantavirus infection - Southwestern United States, interim recommendations for risk reduction. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* Washington USA. v42 (RR.11), p1-13. 1994.

CHAPMAN, L. E.; ELLIS, B. A.; KOSTER, F. T.; SOTIR, M.; KSIAZEK, T. G.; MERTZ, G. J.; ROLLIN, P. E.; BAUM, K. F.; PAVIA, A. T.; CHRISTENSON, J. C.; RUBIN, P. J.; JOLSON, H. M.; BEHRMAN, R. E.; KHAN, A. S.; BELL, L. J.; SIMPSON, G. L.; HAWK, J.; HOLMAN, R. C.; PETERS, C. J. Discrimination between hantavirus infected and uninfected persons enrolled in a trial of intravenous ribavirin for presumptive hantavirus pulmonary syndrome. *Clinical Infections Diseases.* v34, p293-304. 2002.

COIMBRA, T. L. M.; ROCCO, I. M.; SUZUKI, A.; et al. Arthropod and rodent-borne viruses detected in São Paulo, Brazil. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS (eds). *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries.* [Instituto Evandro Chagas, Belém], p168-76. 1998.

DEKONENKO, A.; IBBRAHIM, M. S.; SCHMALJOHN, C. S. A colorimetric PCR- enzyme immunoassay to identify hantaviruses. *Clinical Diagnoses Virology.*v8(2), p113-21. aug1997.

DUCHIN, J. S.; KOSTER, F. T.; PETERS, C. J.; SIMPSON, G. L.; TEMPEST, B.; ZAKI, S. R.; KSIAZEK, T. G.; ROLLIN, P. E.; NICHOL, S.; UMLAND, E. T.; et al. Hantavirus pulmonary syndrome: a clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. *New England J Med.* v330, p949-55. 1994.

ELKHOURY, M. R.; TAVARES, L. S.; LANZIERI, T. M.; DIAS, R. F.; HILLESHEIN, N.; CALDAS, A. C.; WESTPHAL, I. C.; FLORES, S. C. C.; PEREIRA, L. E.; SOUZA, L. T. M.; GARRETT, D. Descrição de um surto familiar de Infecção por Hantavirus em Santa Catarina. FUNASA.dez2000.

ELKHOURY, M. R.; SANTOS, E. D.; VASCONCELOS, P. F. C. et al. Description of five cases of hantavirus infection among a family in Southern Brazil. Presented at The Fifth International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome HFRS, Hantavirus Pulmonary Syndrome HPS, and Hantaviruses. International Symposium Organized by the Mérieux Foundation. Annecy, France. p95. 2001.

ELLIOTT, L. M. Nucleotide sequence analysis of the large (L) genomic RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. *Virology*. v173, p426-36. 1989.

ENRIA, D. A. Clinical and epidemiological characteristics of hantavirus infections in South America. Presented at The Fifth International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome HFRS, Hantavirus Pulmonary Syndrome HPS, and Hantaviruses. International Symposium Organized by the Mérieux Foundation in Annecy, France. p91. 2001.

ENRIA, D. A.; BRIGGILER, A. M.; PINI, N.; LEVIS, S. Clinical Manifestation of New World hantaviruses. *Curr.Top. Microbiol.Immunol*. v256, p117-34. 2001.

FERREIRA, M.S.; NISHIOKA, S.; SANTOS, T.L.; SANTOS, R.P.; SANTOS, P.S.; ROCHA, A. Hantavirus pulmonary syndrome in Brazil: clinical aspects of three new cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. v42(1), p41-6. 2000.

FERRER, J. F.; REY, V.; GONZALEZ, L.; MURUA, A.; GUTIERREZ, S.; THAKURI, M.; FELDMAN, L.; ESTEBAN, E.; POIESZ, B.; GALLIGAN, D.; JONSSON, C. Distribution and prevalence of hantavirus infection in a highly endemic region of Western Paraguay. Presented at The Fifth International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome HFRS, Hantavirus Pulmonary Syndrome HPS, and Hantaviruses. International Symposium Organized by the Mérieux Foundation. Annecy, France. p59. 2001.

FIGUEIREDO, L. T. M.; CAMPOS, G. M.; RODRIGUES, F. B. Síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavirus aspectos epidemiológicos, clínicos, do diagnóstico laboratorial e do tratamento. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v34(1), p13-23.jan2001.

FIGUEIREDO, L. T. M.; MORELLI, M. L.; ALMEIDA, V. S.; FELIX, P. R.; BRUNO, J. C.; FERREIRA, I. B.; MANCANO, F. D. Hantavirus pulmonary syndrome (HPS) in Guariba, SP, Brazil. Report of 2 cases. *Revista do Instituto de Medicina Tropical- São Paulo*. v41(20), p131-7. 1999.

FIGUEIREDO, L. T. M.; MORELLI, M. L.; KASHIMA, S. Diagnosis of 1 fatal case of Hantavirus pulmonary syndrome by reverse-transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. *Virus Reviews & Research*. Journal of the Brazilian Society for Virology. v3-suppl 1, p42(A 06). 1998.

FLORES-LEÓN, R.; MORALES-JIMENÉZ, R. Hantaviruses in Mexico. Presented at The Fifth International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome HFRS, Hantavirus Pulmonary Syndrome HPS, and Hantaviruses. International Symposium Organized by the Mérieux Foundation. Annecy, France. p69 2001.

FURTADO, G.; MULLER, P. Hantavirose no Estado do Paraná. Fita de Vídeo produzida por Natal Jataí de Camargo e Nereu Henrique Macedo. Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. 2001.

GOADE, D. E.; NOFCHISSEY, R. A.; LANZI, R.; ROLDAN, C.; JAMES, D.; GARLIN, A.; KOSTER, F. T.; HANFELT, J.; ANGELI, E.; STEAMS, C.; KETAI, L.; HJELLE, B. Long term fatigue, proteinuria and pulmonary sequelae following HPS. Presented at The Fifth International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome HFRS, Hantavirus Pulmonary Syndrome HPS, and Hantaviruses. International Symposium Organized by the Mérieux Foundation. Annecy, France. p83 2001 jun.

GRAVILOVSKAYA, I. N.; SHEPLEY, M.; SHAW, R.; GINSBERG, M. H.; MACKOW, E. R. Beta3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v95(12), p7074-9. 1998.

GREEN, W.; FEDDERSEN, R. M.; YOUSEF, O.; BEHR, M.; SMITH, K.; NESTLER, J.; JENISON, S.; YAMADA, T.; HJELLE, B. Tissue distribution of Hantavirus antigen in naturally infected humans and deer mice. *J Infect Dis.* v17, p1696-700. 1998.

HALLIN, G. W.; SIMPSON, S. Q.; CRONWELL, R. E.; JAMES, D. S.; KOSTER, F. T.; MERTZ, G. J.; LEVY, H. Cardiopulmonary manifestations of hantavirus pulmonary syndrome. *Critical Care Medicine.* v24, p252-8. 1996 .

HINDRICHSEN, S.; MEDEIROS DE ANDRADE, A.; CLEMENT, J.; LEIRS, H.; McKENNA, P.; MATTYS, P.; NEILD, G. H. Hantavirus infection in Brazilian patients from Recife with suspected leptospirosis. *The Lancet.* v341, p50. 1993.

HJELLE, B.; SPIROPOULOUS, C. F.; TORRES-MARTINEZ, N.; MORZUNOV, S.; PETERS, C. J.; NICHOL, S. T.. Detection of Muerto Canyon virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from patients with Hantavirus pulmonary syndrome . *J Infect Dis.* v170, p1013-17. 1994.

HOLMES, R. R.; BOCCANERA, R.; FIGUEIREDO, L. T. M.; MANCANO, S. R.; PANE, C. Seroprevalence of Human Hantavirus Infection in Ribeirão Preto Region of São Paulo State, Brazil. *Emerging Infections Diseases* v6, p5-6. 2000.

HUGGINS, J. W.; HSIANG, C. M.; COSGRIFF, T. M.; GUANG, M. Y.; WU, Z. O.; LeDuc, J. W.; ZHENG, Z. M.; MEEGAN, J. M.; WANG, Q. N.; et al Prospective, Double-Blind, Concurrent, Placebo-Controlled Clinical Trial of Intravenous Ribavirin Therapy of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *The Journal of Infections Diseases.* v164, p1119-27. 1991 .

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Município de Jardinópolis do Estado de São Paulo. Censo ano 2000. 2000.

IVERSSON, L. B.; DA ROSA, A. P.; ROSA, M. D.; LOMAR, A. V.; SASAKI, Mda. G.; LeDuc, J. W. Infecção humana por hantavírus nas regiões sul e sudeste do Brasil. *Revista Assoc.Médica Brasileira* . v40, p85-92. 1994.

JENISON S, HJELLE B, SIMPSON S, HALLIN G, FEDDERSEN R, KOSTER F. Hantavirus pulmonary syndrome: clinical, diagnostic, and virologic aspects. *Semin Respir Infect* 10(4): 85-92 1995

JOHNSON, A. M.; BOWEN, M. D.; KSIAZEK, T. G.; WILLIAMS, R. J.; BRYAN, R. T.; MILLS, J. N.; PETERS, C. J.; NICHOL, S. T. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology*. v238, p115-127. 1997.

JOHNSON, A. M.; SOUZA, L. T. M.; FERREIRA, I. B.; PEREIRA, L. E.; KSIAZEK, T. G.; ROLLIN, P. E.; PETERS, C. J.; NICHOL, S. T. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. *J. Med Virol*.v59, p527-35. 1999.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. v16, p111-20. 1980.

KOSTER, F. T.; JENISON, S. Epidemiologic linkage of rodent human Hantavirus. Genomic sequences in case investigations of Hantavirus pulmonary syndrome. *J.Infectious Diseases*. v173(4), p781-6. 1996.

KRÜGER, D. H.; ULRICH, R.; LUNDKVIST, A. A. Hantavirus infections and their prevention. *Microbes and Infection*. v3, p1129-44. 2001.

KSIAZEK, T. G.; PETERS, C. J.; ROLLIN, P. E.; ZAKI, S.; NICHOL, S.; SPIROPOULOU, C.; MORZUNOV, S.; FELDMANN, H.; SANCHES, A.; KHAN, A. S.; et al. Identification of a new North American hantavirus that causes pulmonary insufficiency. *Am J Trop Med Hyg*. v52, p117-23. 1995.

KUNO, G.; MITCHEL, C. J.; CHANG, G. J.; SMITH, G. C. Detecting Bunyaviruses of Bunyamwera and California serogroups by a PCR technique. *Journal of Clinical Microbiology* v34(5), p1184-8. 1996.

LAZARO, M. E.; RESA, A. J.; BARCLAY, C. M.; CALANNI, L.; SAMENGO, L.; MARTINEZ, L.; PADULA, P. J.; PINI, N.; LASALA, M. B.; ELSNER, B.; ENRIA, D. A. Hantavirus pulmonary syndrome in southern Argentina. *Medicina (B Aires)*..v60 (3), p289-301..2000

LEDUC, J. W.; SMITH, G. A.; PINHEIRO, F. P.; VASCONCELOS, P. F.; ROSA, E. S.; MAIZTEGUI, J. I. Isolation of a Hantaan-related virus from Brazilian rats and serologic evidence of its widespread distribution in South America. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v34, p810-5. 1985.

LEVIS, S.; MORZUNOV, S. P.; ROWE, J. E.; ENRIA, D.; PINI, N.; CALDERON, G. ; SEBATTINI, M.; St JEOR, S. C. Genetic diversity and epidemiology of Hantaviruses in Argentina. *J Infect Dis.* v177, p529-38. 1998.

MANTOOTH, S. J.; MILAZZO, M. L.; BRADLEY, R. D.; HICE, C. L.; CEBALLOS, G.; TESH, R. B.; FULHORST, C. F. Geographical distribution of rodent-associated hantaviruses in Texas. *J.Vector Ecol.* v26(1), p7-14. jun2001.

MASCARENHAS BATISTA, A.V.; da ROSA, E. S.; KSIAZEK, T. G.; da ROSA, A. P.; LeDuc, J. W.; PINHEIRO, F.; TAVARES-NETO, J. Anticorpos anti-hantavirus em escolares de Salvador, Bahia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v31(5), p433-40. set/out 1998.

McKEE, K.; LeDuc, J.; PETERS, C. Hantaviruses. Textbook of human virology. Belshe RB, p615-32. 1991.

MENDES, W. S.; ARAGÃO, N. J.; SANTOS, H. J.; RAPOSO, L.; VASCONCELOS, P. F.; da ROSA E. S.; ELKHOURY, M. R. Hantavirus pulmonary syndrome in Anajatuba, Maranhão, Br. *Revis Inst Med Trop São Paulo.* v43(4), p237-40. jul/aug2001.

MERTZ, G. J. Bunyaviridae: bunyaviruses, phleboviruses, nairoviruses, and hantaviruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (ed). *Clinical Virology* [Churchill-Livingsstone, New York], p943-72. 1997.

Ministério da Saúde do Brasil. Informações sobre hantavirose no Brasil. 2001.

MORRISON, Y.Y.; RATHBUN, R. C. Hantavirus pulmonary syndrome: the Four Corners disease. *Annal of Pharmacotherapie.* v29, p57-65. jan1995.

NOLTE, K.; FEDDERSEN, R. M.; FOUCAR, K.; ZAKI, S. R.; KOSTER, F. T.; MADAR, D.; MERLIN, T. L.; McFEELEY, P. J.; UMLAND, E. T.; ZUMWALT, R. E.; Hantavirus pulmonary syndrome in the United States: a pathological description of a disease caused by a new agent . *Human Pathology.* v26, p110-20. 1995.

PADULA, P. J.; COLAVECCHIA, S. B.; MARTINEZ, V. P.; GONZALEZ DELLA VALLE, M. O.; EDELSTEIN, A.; MIGUEL, S. D.; RUSSI, J.; RIQUELME, J. M.; COLUCCI, N.; ALMIRON, M.; RABINOVICH, R. D. Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America. *Journal of Clinical Microbiolog.* v38, p3029-35. 2000.

PADULA, P. J.; EDELSTEIN, A.; MIGUEL, S. D.; LOPEZ, N. M.; et al. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* v241(2) p323-30. 1998 .

PARRINGTON, M. A.; LEE, P.W.; KANG, C.Y. Molecular characterization of Prospect Hill virus M RNA segment: a comparison with the M RNA segments of other hantaviruses. *J Gen Virol.* v72, p1845-54. 1991.

PEREIRA, L. E.; FERREIRA, I. B.; SOUZA, R. P.; et al. Serological research on rodents (Muridae, Sigmodontinae) infected by Hantavirus in the State of São Paulo, Brazil. *Virus Reviews & Research*. v3Suppl 1, p42. 1998.

PETERS, C. J.; KHAN, A. S. Hantavirus Pulmonary Syndrome: The New American Hemorrhagic Fever. *Clinical Infectious Diseases*. v34(9), p1224-31. may2002.

ROMANO, N. S. Fatores de Risco e de predição para infecções por Arbovirus e Hantavirus em famílias de área de reserva ecológica no Vale do Ribeira, SP. Tese de Mestrado da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 1996.

SAMBROO, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 2nd-ed [Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York]. 1989.

SCHMALJOHN, C. S.; SCHMALJOHN, A. L.; DALRYMPLE, J. M.. Hantaan virus M RNA: Coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. *Virology*. v157, p31-9. 1987.

SCHMALJOHN, C. S.; HJELLE, B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerging Infectious Diseases*. v3, p95-104. 1997.

SIMONSEN, L.; DALTON, M. J.; BREIMAN, R. F.; HENNESSY, T.; UMLAND, E. T.; SEWELL, C. M.; ROLLIN, P. E.; KSIAZEK, T. G.; PETER, C. J. Evaluatin of the magnitude of the 1993 hantavirus outbreak in the southwestern United States. *Journal of Infectious Diseases*. v 172 (3), p729-33. 1995.

SOSA-ESTANI, S.; MARTINEZ, V. P.; GONZALEZ DELLA VALLE, M.; EDELSTEIN, A.; MIGUEL, S.; PADULA, P. J.; CACASE, M. L.; SEGURA, E, L. Hantavirus in human and rodent population in an endemic area for hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. *Medicina* (Buenos Aires).v62(1), p1-8. 2000.

SOUZA, L. T. M.; FERREIRA, I. B.; PEREIRA, L. E.; SUZUKI, A.; KATZ, G.; TENGAN, C.H.; MAYER, S. R. Hantavirus pulmonary syndrome: Laboratory evidence of hantavirus infection, from 1995 to February 2001. Presented at The Fifth International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome HFRS, Hantavirus Pulmonary Syndrome HPS, and Hantaviruses International Symposium Organized by the Mérieux Foudation. Annecy, France. p75. 2001.

TERAJIMA, M.; HENDERSHOT, J. D.; KARIWA, H.; KOSTER, F. T.; HJELLE, B.; GOADE, D.; DEFRONZO, M. C.; ENNIS, F. A.. High levels of viremia in patients with the hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis*. v180(6), p2030-4. 1999.

TORRES-MORALES, A. E. Soro-epidemiologia da Hantavirose em homens de Salvador-Bahia, Brasil. Tese de Doutorado da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas . 1999.

VASCONCELOS, M. J.; PEDROSO DE LIMA, V. C.; IVERSSON, L. B.; ROSA, M. D.; DA ROSA, A. P.; DA ROSA, E. S.; PEREIRA, L. E.; NASSAR, E.; KATZ, G.; MATIDA, L. H.;

ZAPAROLI, M. A.; FERREIRA, J. J.; PETERS, C. J. Hantavirus pulmonary syndrome in the rural area of Juquitiba, metropolitan area of São Paulo, Brazil. *Revista Inst Medicina Tropical São Paulo*. v39, p237-8. 1997.

WELLS, R. M.; SOSA-ESTANI, S.; YADON, Z. E.; ENRIA, D.; PADULA, P.; PINI, P.; MILLS, J. N.; PETERS, C. J.; SEGURA, E, L. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person to person transmission? *Emerging Infectious Diseases*. v3, p171-4. 1997.

WILLIAMS, E.S.; YUILL, T.; ARTOIS, M.; FISCHER, J.; HAIGH, S.A.
Emerging infectious diseases in wildlife. *Rev Sci Tech*. 2002 Apr;21(1):139-57. Review.

XIAO, S. Y.; LeDuc, J.W.; CHU, Y. K.; SCHMALJON, C. S. Phylogenetic analyses of virus isolates in em genus Hantavirus, family Bunyaviridae. *Virology*. v198, p205-17. 1994.

YOUNG, J. C.; HANSEN, G. R.; GRAVES, T. K.; et al. The incubation period of hantavirus pulmonary syndrome. *Am J Trop Med Hyg*. v62, p714-7. 2000 .

ZAKI, S. R.; GREER, P. W.; COFFIELD, L. M.; GOLDSMITH, L. M.; NOLTE, K. B.; FOUCAR, K.; FEDDERSEN, R. M.; ZUMWALT, R. E.; MILLER, G. L.; KHAN, A. S.; et al. Hantavirus Pulmonary Syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J Pathol*. v146, p552-79. 1995.

ZEITZ, P. S.; BUTLER, J. C.; CHEEK, J. E.; SAMUEL, M. C.; CHILDS, J. E.; SHANDS, L. A.; TURNER, R. E.; VOORHEES, R. E.; SARISKY, J.; ROLLIN, P. E.; et al A case control study of Hantavirus Pulmonary Syndrome during an outbreak in the Southeasten of United States. *J. Infect. Diseases*. v171(4), p864-70. 1995.

ZHAO, X.; HAY, J. The evolution of Hantaviruses. *Immunological Investigations* v26, p191-7. 1997.

8. Summary

The hantaviruses are zoonoses of wild rodents that cause serious human diseases: hemorrhagic fever with renal syndrome in Asia and Europe (10 to 12% lethality rates) and Pulmonary and Cardiovascular Syndrome in the American continent (HPCVS - 59% lethality rate). Hantaviruses (family Bunyaviridae) are enclosing viruses that measure 120 nm approximately, they possess RNA of simple ribbon and negative sense, divided in 3 segments (L, M and S) that are replication in the cytoplasm. The human infection links to the inhalation of aerosols of Hantavirus infected rodents excretes, although reports of person-to-person transmission exist in South America. In the State of São Paulo the infected rodents found were the *Bolomys lasiurus*, the *Akodon cursor* and the *Oligoryzomys negrips*.

From the first 3 cases of hantaviruses described in Brazil (1993) with individuals inhabitants of the rural area of Juquitiba, SP, evidencing the first well-known supplies of HPCVS, more than a hundred cases have been notified in Brazil, causing 60 deaths (of 46% lethality rate). There have been fourteen cases of HPCVS since 1998 to 2001 with of 64,2% letality rate, in the Ribeirão Preto area what motivated this work.

One of the objectives was clinical and epidemic aspects studies of the cases of hantaviruses that happened in the Area of Ribeirão Preto, from 1998 to 2001, to know the behavior of the hantaviruses in this area. Analyzing and accompanying patient medical records of 14 patients with HPCVS, fever was observed (100% of the cases), disnea and coughs (64,2%), accompanied of arterial hipotension, tachicardia (64,2%), migraine and digestive symptoms (57%); adynamic and general weakness (50%), hemorrhagic phenomenons (28,5%), mialgia (21,4%) and convulsion (7,5%). In the laboratorial profile the platelets count $<130000/\text{mm}^3$ (100%), hematocrit $>55\%$, (78,6%); leucocytosis $>15000/\text{mm}^3$ (64,2%), neutrofilia $>7000/\text{mm}^3$ and small sticks $>600\text{ cels}/\text{mm}^3$ (64,2%), creatinine serical level $>1,5\text{mg}/100\text{ml}$ (63,6%) and $\text{PO}_2 <70\text{ mmHg}$ (54,5%). The diagnosis laboratorial of the hantaviruses was made by ELISA for IgM and IgG anti Sin Nombre after the discharge.

There was significant difference among fatal and surviving cases, as the hantaviruses diagnosis suspicious ($p=0,0152$) and parenteral hydratation ($p=0,0152$): in the survivors, the HPCVS diagnosis suspicious was made between the 1st and the 2nd day of internment and the fatal cases, the suspicion was just made to the necropsies. Among infusion of liquid EV³ over 2500 ml in the first 24 hours of treatment and evolution for the death. The precocious oxygen support, mechanics ventilation, as well as the use of vasoatives amines and the one of corticosteróides, did not have association with survival and the shock presence did not have association with death.

The second objective was to antibodies for Hantavirus prevalence studies in the Area of Ribeirão Preto, in the population of Jardinópolis, SP. In the previous study among cities in that area it was obtained larger index of serologic prevalence (4,5%) for Hantavirus, it was in the Jardinópolis county

Through ramdomised collection partly of the rural area and whole urban area, we obtained 818 samples of blood, inhabitants between 15 and 70 years, for digital puncture in filter paper and important data as age, gender, color, origin, professional activity, address, telephone; current disease, medications in use, pneumonia serious, dwelling type, number of inhabitants in the house, sewer, collects of garbage, barn, contact with rodents. These samples were processed, in the dilutions 1/50, 1/100, 1/400 and 1/1600. and submitted to indirect ELISA for detection of IgG for Hantavirus Los Andes. The results were analyzed by Fisher and Qui-square tests, using the InStat 3.0 program (GraphPad.Software Inc, USA) and for the one of 5%, with interval of trust of 95%.

The general positivity rated 14,3% with ELISA (at title 50), urban zone (15,3%) and in rural zone 6,5% and they demonstrated high rates for the population of the Jardinópolis county.

Comparing the positivity rates for Hantavirus between urban and rural zone inhabitants was significantly larger for the urban inhabitants ($p = 0,0183$). Significant increase was observed for the age group of 21 to 30 years ($p = 0,0117$) and for the one of 31 to 40 years ($p = 0,0036$) among different age groups. There was not significant difference of positivist for Hantavirus between men and women ($p = 0,0892$); nor for individuals with urban and rural professional activity ($p=0,8799$), neither for the individuals that referred serious pneumonia ($p = 0,6096$) as well as in the individuals that declared contact with rodents ($p = 0,4842$). There was not association among titles of 100 and 400 for Hantavirus with gender, local of habitation, contact with rodents and pneumonia serious

ANEXOS:**Modelo de ficha de coleta:**

FICHA DE COLETA		Nº
Identificação: Nome: _____ idade: _____ sexo: _____ cor: _____ Endereço: _____ telefone: _____ Atividade Profissional: _____
Antecedentes mórbidos: Doença em tratamento: _____ Pneumonia grave: _____ Medicamentos em uso: _____ Mortes inexplicadas: _____		
Local de Habitação: Celeiro: _____ Material moradia: _____ Contato roedores: _____ Coleta de Lixo: _____ Esgoto: _____
Data: _____ Responsável pela coleta: _____		