UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
CENTRO DE PESQUISA EM VIROLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Isolamento de hantavírus em cultura de células

Danilo Machado de Melo

Ribeirão Preto

2017

DANILO MACHADO DE MELO

Isolamento de hantavírus em cultura de células

Dissertação de mestrado a ser apresentada ao curso de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo.

Ribeirão Preto, SP

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Melo, Danilo Machado.

Isolamento de hantavírus em cultura de células/ Danilo Machado de Melo;

50f. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo - Ribeirão Preto, 2017.

1. *Hantavírus* 2. ARQV 3. Isolamento viral.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Danilo Machado de Melo

Título: Isolamento de hantavírus em cultura de células

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-
Imunologia Básica e Aplicada

Apresentada em 14/11/2017.

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Luíz Proença Módena
Universidade Estadual de Campinas.

Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Profa. Dra. Alessandra Abel Borges
Universidade Federal do Alagoas.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Simone Machado da Rocha e minha vó Marli Sarmiento de Melo. Aos meus irmãos Artur, Aurélio, Gabriel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo pela orientação, todos os ensinamentos e a oportunidade que me foi dada.

Agradeço ao Dr Gilberto Sabido dos Santos Junior por contribuir na orientação, idealização de experimentos, pela amizade e por todo o apoio durante minha estada aqui.

À Dr. Julianne Vargas por ajudar em todos os experimentos realizados e pela amizade e sua disponibilidade e boa vontade em ajudar.

Ao Ms William Marciel de Souza, Ms Natalia Barbosa e Ms Ricardo Cardoso pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores, Dr. Eurico Arruda Neto e Dr. Luis Lamberti, pelas sugestões e orientações no decorrer do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro concedido. Assim como a fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP).

À Soraya Jabour Badra técnica do laboratório de virologia e amiga, pelo apoio no trabalho e na vida pessoal. Por sua amizade, cuidado e carinho.

Às técnicas de laboratório de microscopia Elizabeth Rosa e Roberta Rosales pelo treinamento e auxílio no uso dos microscópios.

Aos amigos do laboratório Aline Tolardo, Alexandre Paulosso, Angélica Silva, Felipe Carvalho, Felipe Maia, Leonardo La Serra, Marcilio Fumagalli, Marilia Farignoli, Priscila Mamani, Queren Suursoo por ajudar em discussões, ideias, apoio moral, pela amizade, companheirismo e por todos os puxões de orelha para que me tornasse uma pessoa melhor.

A Sueli pelo suporte técnico, por deixar tudo sempre em ordem e ser tão solícita em ajudar.

À Ana Cristine S. Ferreira, secretária do programa em Imunologia Básica e Aplicada, que sempre teve uma enorme paciência e disposição em me ajudar.

À professora Dr^a Alessandra Borges e Dr^a Vanessa Muler pelo apoio e incentivo a vir a Ribeirão Preto para a pós-graduação.

À minha família, em especial a minha mãe Simone Rocha, vó Marli Melo e tia Suely Sarmiento. Obrigado a todos pelo apoio e incentivo, por sempre acreditarem em minha capacidade.

Aos amigos que fiz em Ribeirão, em especial Alexandre Aguiar, Gabriel Pássaro e Gabriella Bessa.

Agradeço, por fim, à todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

RESUMO

MELO, D. M. **Isolamento de hantavírus em cultura de células**. 2017-50f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Hantavirus é um gênero na família *Hantaviridae*, incluindo agentes polimórficos, envelopados e com genoma de RNA fita simples, polaridade negativa e trissegmentado. Os Hantavírus são zoonóticos e mantidos na natureza em reservatórios das ordens Rodentia, Soricomorpha e Chiroptera. No Brasil, foram descritos 8 Hantavírus e destes, 6 causam doença humana grave e de alta letalidade, a Síndrome Pulmonar e Cardiovascular, sendo dentre eles o Araraquara (ARQV) o vírus de ocorrência nas regiões de Cerrado do Sudeste (incluindo Ribeirão Preto) e Planalto Central. ARQV destaca-se por produzir a maior letalidade dentre todos os Hantavírus existentes e possuir como reservatório o roedor silvestre *Necromys lasiurus* que o transmite ao homem por inalação dos aerossóis contaminados de suas excretas. Neste trabalho, detectamos genoma de Hantavírus em tecidos de *Necromys lasiurus* e em tecidos de morcego *Desmodus rotundus*, ambos capturados no Nordeste do Estado de São Paulo. Destes animais, foram feitas tentativas de isolamento de Hantavírus a partir de amostras de tecido de *Necromys lasiurus* e *Desmodus rotundus*. Os procedimentos foram realizados em laboratório de nível de biossegurança 3, onde fizeram-se as inoculações em cultura de células VERO E6, com detecção viral após uma única passagem de 4 dias. Desta forma, foi possível isolar um Hantavírus a partir de sobrenadante do lisado de coração do roedor, o que foi confirmado pela presença do genoma viral do isolado por RT-PCR do sobrenadante de cultura celular e dos antígenos virais nas células Vero E6, por imunofluorescência indireta e *western blot*. O processo de isolamento mostrou-se reprodutível, por 3 vezes, para o mesmo tecido do roedor. Tais resultados encorajam que esta metodologia para isolamento de Hantavírus deva ser experimentada por mais vezes. O Hantavírus isolado (provavelmente ARQV) deverá fornecer importantes informações sobre seu genoma completo, além de propiciar vários estudos futuros.

Palavras chave: *Hantavirus*, ARQV, Isolamento viral.

ABSTRACT

MELO, D. M. **Isolation of hantavirus in cell culture.** 2017-50p. Masters dissertation. Medical School of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

*Hantavirus is a genus in the Hantaviridae family, including polymorphic agents, it is enveloped and with a single stranded RNA genome, negative and tri-polarity polarity. Hantaviruses are zoonotic and kept in nature in reservoirs of the orders Rodentia, Soricomorpha and Chiroptera. There are 8 hantaviruses recorded in Brazil, 6 of them cause severe human disease and high lethality, a Pulmonary and Cardiovascular Syndrome, among which Araraquara (ARQV) is the virus that occurs in the Southeastern Cerrado (including Ribeirão Preto) and Central Plateau. ARQV stands out for producing higher lethality among all existing hantaviruses and has as reservoir the wild rodent *Necromys lasiurus*, which transmits to humans by inhalation of the contaminated aerosols of their excreta. In this work, we detected the genome of hantavirus in *Necromys lasiurus* and *Desmodus rotundus*, bat tissues, both captured in the Northeast of the State of São Paulo. Of these animals, attempts were made to isolate hantavirus from tissue samples of *Necromys lasiurus* and *Desmodus rotundus*. The laboratory tests of biosafety level 3, where inoculations in culture of VERO cells E6 were done, with viral detection after a single passage of 4 days. Thus, it was possible to isolate hantavirus from the rodent heart lysate supernatant, which was confirmed by the presence of the viral genome of the isolate by RT-PCR of the cell culture supernatant and the viral antigens in the Vero E6 cells by Indirect Immunofluorescence and Western Blot. The isolation process was reproducible, 3 times, for the same tissue of the rodent. These results indicate that this methodology for hantavirus isolation should be tested more often. The isolated Hantavirus (ARQV), should provide important information about its complete genome, as well as providing several future studies.*

Key words: Hantavirus, ARQV, Viral isolation.

LISTA DE LUSTRAÇÕES

Figura 1: Locais de ocorrência de casos de Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavírus.....	16
Figura 2: Mapa da América do Sul com distribuição de Hantavírus causadores de Síndrome Cardiopulmonar e seus respectivos roedores reservatórios.....	17
Figura 3: Morfologia dos <i>Hantaviridae</i>	18
Figura 4: Esquema da Replicação dos Orthohantavirus.....	19
Figura 5: Roedores-reservatório de Hantavírus no Brasil.....	20
Figura 6: Mapa do mundo ilustrando a localização de roedores e outros pequenos mamíferos hospedeiros de Hantavírus.....	21
Figura 7: Imunofluorescência de células VERO E6 em lamínulas de vidro, inoculadas com o Hantavírus RIOMV e controle negativo (células não infectadas).....	32
Figura 8: Imunofluorescência de células A549, 4 dias após inoculação com amostra oriunda de sobrenadante de culturas de células inoculadas com lisado de coração do roedor <i>Necromys lasiurus</i>	33
Figura 9: Imunofluorescência de células VERO E6, 4 dias após inoculadas com amostra oriunda de sobrenadante de culturas de células inoculadas com lisado de coração do roedor <i>Necromys lasiurus</i>	33
Figura 10: Immunoblot dos sobrenadantes das culturas celulares Vero E6 e A549, com marcação para proteína N utilizando MIAF anti-N de Hantavírus	33
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose a 1.8% em TAE, corada por gel red, exibindo amplicons de RT-PCR compatíveis com fragmentos dos segmentos genômicos M (gene Gn) e S (gene N) do Hantavírus em amostras oriundas de sobrenadantes de culturas de células VERO E6 e A549 inoculadas com lisado de coração do roedor	34
Figura 12: Eletroforese em gel de agarose a 1.8% em TAE, corada por gel red, exibindo amplicons de RT-PCR compatíveis com fragmentos dos segmentos genômicos M (gene Gn) e S (gene N) do Hantavírus em amostras oriundas de sobrenadante de culturas de células VERO E6 inoculadas com lisado do coração do roedor, em três repetições do isolamento viral.....	35
Figura 13: Eletroforese em gel de agarose a 1.8% em TAE, corada por gel red, exibindo amplicons de RT-PCR compatíveis com fragmentos dos segmentos genômicos M (gene Gn) e S (gene N) do Hantavírus oriundos de tecidos do morcego	35

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose a 1.8% em TAE, corada por gel red, exibindo amplicons de RT-PCR compatíveis com fragmentos dos segmentos genômicos M (gene Gn) e S (gene N) do Hantavírus oriundas de sobrenadantes de culturas de células VERO E6 inoculadas com tecidos e urina do morcego.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados na RT-PCR para Hantavírus.....	27
Tabela 2: Amostras disponíveis para isolamento após RT-PCR positiva e sequenciamento.....	31

LISTA DE SIGLAS

AD	– Anno Domini
ANDV	– Vírus Andes
ANJV	– Vírus Anajatuba
ARQV	– Vírus Araraquara
ASAV	– Vírus Asama
CASV	– Vírus Castelo dos Sonhos
CBNV	– Vírus Cao Bang
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
EUA	– Estados Unidos da América
ELISA	– Ensaio Imunoenzimático
HTNV	– Vírus Hantaan
ICTV	– International Committee on Taxonomy of Viruses
IFA	– Ensaio de Imunofluorescência
IFN- γ	– Interferon gamma
JUQV	– Vírus Juquitiba
LNV	– Vírus Laguna Negra
NBS-3	– Nível de segurança 3
PBS	– Tampão Fosfato Salino
PCR	– Reação da Polimerase em Cadeia
RIOMV	– Vírus Rio Mamoré
RNA	– Ácido Ribonucleico
RPLV	– Vírus Camo Ripley
RT	– Transcriptase Reversa
SEOV	– Vírus Seoul
SFB	– soro fetal bovino
SNV	– Vírus <i>Sin Nombre</i>
SPCVH	– Síndrome Pulmonar e Cardiovascular
SWSV	– Vírus Seewis
TGNV	– Vírus Tangaya
TPMV	– Vírus Thottapalayam

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. HANTAVIRUS	14
1.2. HISTÓRICO	14
1.3. O VÍRUS	17
1.4. ANIMAIS-RESERVATÓRIO	19
1.5. HANTAVIROSE	21
1.6. ISOLAMENTO	22
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. MATERIAIS PARA ISOLAMENTO VIRAL	25
4.2. CULTURA CELULAR.....	25
4.3. ISOLAMENTO VIRAL	26
4.4. CONFIRMAÇÃO DE ISOLAMENTO VIRAL	26
4.4.1 Teste de imunofluorescência indireta (IFA)	26
4.4.2. RT-PCR.....	26
4.4.3. Imunoblot.....	28
4.5. QUANTIFICAÇÃO DE HANTAVÍRUS POR CONTAGEM DE MICROPLAQUES	29
4.6. QUANTIFICAÇÃO DE HANTAVÍRUS POR CONTAGEM DE FOCO-FLUORESCÊNCIA ...	29
5. RESULTADOS	31
5.1. TRIAGEM DE AMOSTRAS	31
5.2. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PARA ISOLAMENTO DE HANTAVÍRUS.....	31
5.3. ISOLAMENTO VIRAL	32
5.4. QUANTIFICAÇÃO DO HANTAVÍRUS ISOLADO	36
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÃO.....	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hantavirus

Os Hantavírus eram classificados como membros da família *Bunyaviridae* e gênero *Hantavirus* (ICTVdB, 2015). Porém, foram recentemente reclassificados na ordem *Bunyavirales*, família *Hantaviridae* e gênero *Orthohantavirus* (ICTVdB, 2016). Dentre os vários Hantavírus descritos no mundo apenas 41 são oficialmente aceitos como espécies virais (ICTVdB, 2016).

1.2. Histórico

Uma das primeiras descrições, que apresenta a febre hemorrágica com síndrome renal, que hoje é relacionada à infecção por Hantavírus, data de 960AD e foi encontrada em um guia médico chinês. Outra descrição foi feita em 1913, em registros médicos obtidos no extremo oriente da Rússia. Posteriormente, já em 1934, a nefropatia epidêmica foi descrita concomitantemente por um médico russo e dois suíços (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010).

Entre os anos de 1914 e 1918, durante a I Guerra Mundial, foram descritos casos da então conhecida “nefrite de trincheira”, que hoje sabemos ser devida a infecções por Hantavírus e ocasionada pelo maior contato destes soldados com roedores infectados. Entre os anos de 1939 e 1945, no decorrer da segunda guerra mundial foram relatados mais de 12 mil casos de febre hemorrágica que acometeu soldados japoneses na fronteira entre Rússia e China. A prevalência da doença neste surto levou a experimentos com humanos, na Rússia, Japão e China. Estes experimentos consistiam na inoculação em voluntários ou prisioneiros de guerra de sangue e urina filtrados de pacientes com febre hemorrágica. Estes estudos mostraram que a doença era causada por microrganismos filtráveis (vírus) e que podia ser propagada entre seres humanos.

Um grande surto por este até então desconhecido agente infeccioso ocorreu entre 1951 e 1954, durante a Guerra da Coreia, no qual mais de 3000 soldados ficaram doentes com insuficiência renal, hemorragia e choque. Este surto de doença hemorrágica, que teve letalidade de 7%, fez o ocidente dar atenção à doença e interessar-se pela pesquisa de seu agente etiológico (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010). Entretanto, a causa da doença permaneceu desconhecida até 1978.

Apenas em 1964 foi isolado o primeiro Hantavírus, o Thottapalayam (TPMV), a partir de amostra de musaranho (*Suncus murinus*) durante pesquisa sobre encefalite japonesa, no

sudoeste da Índia (SONG et al., 2007a). Descrito em 1964, este vírus permaneceu como um Bunyavirus não classificado até 1989 (ZELLER et al., 1989).

Realizaram-se, por vários anos, estudos sem sucesso buscando pelo agente etiológico da febre hemorrágica que havia infectado tantos soldados durante a guerra, porém tais estudos não obtiveram sucesso. Então os médicos focaram a atenção nos roedores das zonas rurais onde as infecções humanas ocorreram e, em 1976, utilizando imunofluorescência dos tecidos de pulmão do roedor *Apodemus agrarius* revelada com o soro de paciente convalescente da febre hemorrágica, o vírus foi detectado. Em 1978, este vírus, denominado Hantaan (HTNV), foi finalmente isolado em cultura de células (LEE et al., 1978).

Em 1984 ocorreu o isolamento em roedores do primeiro Hantavírus patogênico para o homem no novo mundo, tratava-se do vírus Seoul (SEOV). Entretanto, foi em 1993 que observou-se surto de uma doença predominantemente respiratória que foi associada a Hantavírus. Descreveu-se nesta ocasião a síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavírus (SPCVH) na região de Four Corners, Estados Unidos (EUA), causada por vírus que curiosamente foi denominado Sin Nombre (SNV) (HJELLE et al 1995; NICHOL et al., 1993). Ainda, em 1993, descreveram-se os 3 primeiros casos de SPCVH no Brasil. Estes casos ocorreram em Juquitiba, interior do estado de São Paulo, e por isso, este novo Hantavírus, foi denominado Juquitiba (JUQV) (DA SILVA, et al., 1997, VASCONCELOS et al., 1997). Em 1994, foram encontrados morcegos com anticorpos para HTNV na Coreia do sul que, também, foi isolado (KIM; LEE; PARK, 1994). Em 1996, durante um surto de SPCVH, descreveu-se o vírus Andes (ANDV) (LOPEZ et al., 1996).

Ainda que até este momento Hantavírus estivessem principalmente relacionados a roedores, estudos posteriores permitiram que estes vírus fossem reconhecidos em outras espécies de musaranhos, como o vírus o Tanganya (TGNV), na espécie *Crocidura theresae* em 2007. Ainda em 2007, outros três genótipos de Hantavírus foram detectados em musaranhos; Camo Ripley virus (RPLV) nos EUA, Seewis virus (SWSV) na Suíça e Cao Bang virus (CBNV) no Vietnã (ARAI et al., 2007, SONG et al., 2007b, 2007c). Outro reservatório posteriormente relacionado aos Hantavírus é a toupeira, com o primeiro genótipo de Hantavírus isolado de um animal no Japão e denominado Asama (ASAV) (ARAI et al., 2008).

Desde então se acredita que os Hantavírus são mantidos na natureza em animais reservatório das ordens Rodentia, Soricomorpha, e Chiroptera (VAHERI et al., 2013). Dentre diversos Hantavírus já descritos no mundo, apenas 41 são considerados como espécies oficiais pelo ICTV.

Com base em genomas de Hantavírus causadores de SPCVH no Brasil, Johnson e colaboradores (1999) descreveram em 1999 o vírus Castelo dos Sonhos (CASV), obtido de um paciente da vila de Castelo dos Sonhos, em Altamira, PA, em 1995 e o vírus Araraquara (ARQV) obtido de dois pacientes dos municípios de Araraquara e Franca, SP, em 1996, como pode ser observado na **Figura 1**. Foram descritos outros dois casos fatais de SPCVH, em agricultores do município de Guariba-SP em 1998, (FIGUEIREDO et al., 1999a).

Figura 1: Locais de ocorrência de casos de Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavírus. Oval pretos indicam a localização da residência do caso ou o local provável da exposição, quadrados pretos indicam as principais cidades do Rio de Janeiro e São Paulo. Os estados de São Paulo e Mato Grosso também indicados (JOHNSON et al., 1999).

Seis dos 8 Hantavírus conhecidos no Brasil são patogênicos: Anajatuba (ANJV), Castelo dos Sonhos (CASV), Laguna-Negra símile (LNV), Araraquara (ARQV), Juquitiba (JUQV) e Rio Mamoré (RIOMV), apresentados na **Figura 2** (ROSA et al., 2005, 2010, FIGUEIREDO et al., 2009, RABONI et al., 2009, TRAVASSOS DA ROSA et al., 2012, OLIVEIRA et al., 2014; FIRTH et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2014). ARQV ocorre nas regiões de Cerrado do Sudeste e Planalto Central brasileiro incluindo a região de Ribeirão Preto e o roedor *Necromys lasiurus* é seu reconhecido reservatório (SUZUKI et al 2004).

Recentemente, ARQV foi encontrado em morcegos, o que pode incrementar ciclos de manutenção e transmissão desse vírus altamente letal (DE ARAUJO et al., 2012; SABINO-SANTOS Jr et al., 2015). A Síndrome Pulmonar e Cardiovascular (SPCVH) quando causada por ARQV costuma ter 50% de letalidade. Por esta razão, ARQV, provavelmente, é o

Hantavírus mais virulento do mundo (FIGUEIREDO, L. T. M. et al., 2009; FIGUEIREDO, G. G. 2010).

Figura 2: Mapa da América do Sul com distribuição de Hantavírus causadores de Síndrome Cardiopulmonar e seus respectivos roedores reservatórios. Estes vírus são Andes vírus (variante Bermejo, Oran, Lechiguana, Andes Central Plata, Araucária, Araraquara, Juquitiba, Castelo dos Sonhos e Tunari), Rio Mamoré vírus (variante Maripa e Anajatuba) e Laguna Negra vírus (variante Laguna Negra-like) (FIGUEIREDO et al., 2014).

1.3. O vírus

Os *Hantaviridae* do gênero *Orthohantavirus* são polimórficos, envelopados e possuem genoma de RNA composto de 3 segmentos de fita simples e sentido negativo: o segmento S (*small*/pequeno), o M (*medium*/médio) e o L (*large*/grande). O segmento S codifica a nucleoproteína N e a proteína não estrutural NSs, o segmento M codifica 2 glicoproteínas do envelope viral Gn e Gc (antes denominadas G1 e G2 respectivamente) e o segmento L codifica a proteína L (RNA polimerase dependente de RNA), como pode ser observado na **Figura 3** (ELLIOTT, 1989A, 1989B; FIGUEIREDO, 1999b; HJELLE; TORRES-PÉREZ 2010; VAHERI et al., 2013).

Figura 3: Morfologia dos *Hantaviridae*. **A)** Representação esquemática do vírus. A partícula de Hantavírus contém o genoma de RNA viral trissegmentado, composto dos três segmentos genômicos de RNA (S, M e L) e encontram-se complexados com a nucleoproteína N formando as ribonucleoproteínas virais. A parte externa do virion consiste em picos compreendendo quatro unidades de cada glicoproteína, Gn e Gc. O genoma viral é replicado e transcrito por RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp). **B)** Uma partícula de Hantavírus visualizada por microscopia crioelectrônica (VAHERI et al., 2013).

Hantavíridae infectam células endoteliais, epiteliais, células do sistema imune, como macrófagos, células dendríticas e linfócitos (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010). A partícula viral liga-se a receptores da célula hospedeira, sendo ligantes as proteínas virais Gn e Gc (ELLIOTT; SHMALJOHN, 2013). Ocorre então a internalização da partícula viral por endocitose, fundindo-se as membranas viral e endossômica com consequente liberação da ribonucleoproteína viral no citoplasma celular, pois o genoma não sofre desnudamento total, permanecendo associado a várias cópias da proteína N e à proteína L (FIGUEIREDO, 1999b). Inicialmente ocorre a transcrição primária do RNA (-) viral pela RNA polimerase, produzindo RNA mensageiro ou RNA (+) complementar. Em seguida ocorre a tradução dos RNAm dos segmentos L e S por ribossomos livres e tradução do RNAm do segmento M em ribossomos de membrana. A polimerase viral muda de função, deixa de traduzir RNAm e passa a replicar e amplificar o genoma viral, realizando a transcrição do RNA (+) complementar para formação das novas partículas virais (ELLIOTT; SHMALJOHN, 2013). As fitas recém sintetizadas são recobertas por cópias da proteína N formando ribonucleoproteínas que são transportadas via trans-golgi e liberadas por pinocitose

reversa, com fusão de membranas das vesículas citoplasmáticas à membrana celular (**Figura 4**) (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010).

Figura 4: Esquema da Replicação dos Orthohantavirus. (1) Inicia-se o processo, com a ligação dos receptores β integrinas e co-receptores CD55 às glicoproteínas Gc e Gn respectivamente; (2) a entrada viral depende de clatrina, formando-se o endossoma primário que ao ser acidificado (pH 5) como endossoma tardio permite a fusão do envelope viral à membrana endossômica com internalização e desnudamento do genoma no citoplasma; (3) ocorre captura de sequências Cap dos RNAs mensageiros celulares pela polimerase de RNA formando-se os RNAs mensageiros virais; (4) a tradução dos transcritos dos segmentos S e L ocorre em agrupamentos polirribossomais no citosol e a dos transcritos de segmento M, Gn e Gc, em ribossomos associados ao RER; (5) a replicação do genoma viral é dependente da síntese de N que emite sinal para a polimerase de RNA viral mudar da síntese de RNAs mensageiros à de RNAs complementares e síntese dos genomas da progênie; (6) a montagem das novas partículas virais acontece no complexo de Golgi para Hantavírus do Velho Mundo e na, membrana plasmática contendo glicoproteínas previamente ancoradas, para os Hantavírus do Novo Mundo; (7) saída das novas partículas mediado por microfilamentos de actina (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010).

1.4. Animais-reservatório

Os Hantavírus são mantidos na natureza em animais-reservatório das ordens Rodentia, Soricomorpha e Chiroptera (**Figura 5**) (VAHERI et al., 2013).

Figura 5: Roedores-reservatório de Hantavírus no Brasil (OLIVEIRA, et al.2014)

Os Hantavírus causam infecções crônicas inaparentes nos animais-reservatório e podem ser identificados em diferentes órgãos destes animais (TESE CAMPOS, 2002). Hantavírus costumam apresentar especificidade quanto ao reservatório (HJELLE; TORRES-PÉREZ, 2010). A relação restrita entre os Hantavírus e seus animais-reservatório faz com que a distribuição geográfica de cada Hantavírus limite-se geograficamente à destes animais, como mostrado na **Figura 6** (KRÜGER; SHÖNRICH; KLEMPA, 2011).

As espécies de roedores-reservatório dos Hantavírus pertencem às famílias: **(i)** Muridae, subfamília Murinae (camundongos e ratos) que são originárias do velho mundo mas se espalharam, com o homem, por todo o planeta e **(ii)** a Cricetidae, com três subfamílias, Arvicolinae, Neotominae e Sigmodontinae (camundongos e ratos encontrados no novo mundo). No Brasil, as oito espécies hospedeiras de Hantavírus pertencem à família Cricetidae e subfamília Sigmodontinae, são elas: *Akodon montensis*, *Calomys callidus*, *Holochilus sciureus*, *Necromys lasiurus*, *Oligoryzomys nigripes*, *Oligoryzomys utiariensis*, *Oligoryzomys fornesi* e *Oligoryzomys microtis* (OLIVEIRA et al., 2014).

Figura 6: Mapa do mundo ilustrando a localização de roedores e outros pequenos mamíferos hospedeiros de Hantavírus (GUO et al., 2013).

1.5. Hantavirose

Hantavírose são zoonoses que se mantem na natureza infectando pequenos mamíferos e estes vírus, eventualmente, infectam o homem. Hantavírus são transmitidos pela inalação de aerossóis das excretas de animais infectados (SCHMALJOHN; HJELLE, 1997). Infecções agudas em seres humanos podem resultar desde quadros inaparentes a casos graves e característicos (DEARING; DIZNEY, 2010). Classicamente, são doenças causadas por Hantavírus: Síndrome Renal com Febre Hemorrágica (HFRS) e a Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por *Hantavirus* (SPCVH). A HFRS ocorre predominantemente na Eurásia e compromete principalmente os rins, enquanto que a SPCVH ocorre predominantemente nas Américas, acometendo, de forma mais característica os pulmões (SCHMALJOHN; HJELLE, 1997). Clement e colaboradores (2012, 2014), observando que esta classificação é meramente didática, ressalta que manifestações renais e pulmonares ocorrem na SPCVH e na HFRS, propondo a unificação dessas síndromes com o nome febre do Hantavírus.

No Brasil o primeiro registro da SPCVH foi em 1993, em Juquitiba, no estado de São Paulo (DA SILVA et al., 1997). Desde então, outros estados brasileiros notificaram casos de SPCVH, porém dos 27 estados brasileiros apenas 16 registraram casos da doença (BRASIL, 2014b). Entre os anos de 1993 e 2014 foram confirmados 1.884 casos em humanos no Brasil (BRASIL, 2014a). No mesmo período foram registrados 722 óbitos por hantavirose (BRASIL, 2014b).

Como até o momento não existem agentes com ação antiviral eficaz nos pacientes o tratamento da SPCVH é de suporte, orientado para o controle dos sintomas apresentados. Pacientes graves são tratados em unidades de terapia intensiva onde são utilizadas medidas de suporte clínico para manutenção das funções vitais (BRASIL, 2010). A Ribavirina, que é uma droga antiviral não específica, demonstra algum efeito na redução da replicação dos Hantavírus *in vitro* e *in vivo*, mas não produz efeito benéfico em tempo hábil nos pacientes com SPCVH. Também, a Ribavirina pode causar efeitos colaterais como a anemia (KRÜGER et al., 2014).

Para prevenir infecção por Hantavírus são adotadas medidas de controle dos animais-reservatório, tais como (i) redução de fontes de abrigo e de alimentação dos roedores, (ii) desratização intra e peridomicílio, (iii) informar grupos de trabalhadores que se expõem ao contato com o roedor, assim como ecoturistas, caçadores e pescadores e (iv) descontaminar ambientes de risco (BRASIL, 2010).

O diagnóstico laboratorial das infecções por Hantavírus é realizado por detecção de anticorpos IgM contra o vírus por ELISA. Também, antígenos virais são pesquisados por imunohistoquímica, em fragmentos de órgãos colhidos até oito horas pós-óbito do paciente, Genomas de Hantavírus são pesquisados em todos os tipos de materiais clínicos por RT-PCR (BRASIL, 2010).

1.6. Isolamento

O primeiro isolamento de Hantavírus nas Américas foi feito em 1985, por LeDuc e colaboradores a partir de amostras de roedores. Isolaram em cultura de células VERO E6, vírus relacionado ao Hantaan a partir de amostras de tecidos de *Rattus norvegicus* capturados em Belém do Pará. Utilizaram sobrenadante do lizado de fragmentos de pulmão e baço dos roedores para inocular *Rattus rattus*. Após 48 dias, animais com anticorpo anti-Hantaan tinham os tecidos coletados, e a suspensão do lizado destes tecidos era inoculada em cultura de células VERO E6 e incubadas de 7 a 10 dias, quando eram manipuladas, para nova passagem. Apenas após o trigésimo primeiro dia pôde-se observar antígeno viral na cultura de células VERO E6 por meio de imunofluorescência direta (mais de 60% das células apresentavam a presença do antígeno viral).

Quanto ao primeiro isolamento de Hantavírus a partir de amostras humanas nas Américas, foi realizado em 2002, do soro de uma criança (GALENO et al., 2002). A amostra não demonstrou presença de anticorpos IgG e IgM para Hantavírus, porém o vírus Andes foi

isolado após 3 passagens cegas em cultura de células VERO E6. Este isolamento foi confirmado por imunofluorescência, ELISA e RT-PCR.

Os isolamentos de Hantavírus, como mostrado acima, tem sido realizados por meio de passagens cegas sucessivas em células VERO E6, incubando células por 14 a 26 dias (DIGLISIC et al., 1994; SCHMALJOHN et al., 1995; VAPALATHI, 1996; FULHORST et al., 1997; LUNDKVIST et al., 1998; NEMIROV et al., 1999; POWERS et al., 1999; VAPALATHI, 1999; PAPA et al., 2001; KLEMPA et al., 2005; ZHANG et al., 2007; YU et al., 2011; DZAGUROVA, 2012; SANADA, 2012; KARIWA et al., 2012; JAMESON et al., 2013; LI et al., 2013; CROSS et al., 2014).

Também, já foi realizado um isolamento de vírus Hantaan a partir de amostras de pulmão de morcegos (KIM; LEE; PARK, 1994).

2. JUSTIFICATIVA

O Hantavírus Araraquara (ARQV), que ocorre nas regiões de Cerrado do Sudeste e Planalto Central brasileiro, causa SPCVH com alta letalidade (50%) (FIGUEIREDO, L. T. M. et al., 2009; FIGUEIREDO, G. G. 2010). Apesar da evidente importância deste patógeno em saúde pública, o isolamento do ARQV ainda não foi realizado. Este isolamento é necessário para que venham a ser desenvolvidos diversos estudos relacionados a ultraestrutura e replicação viral; estudos epidemiológicos em animais-reservatório; estudos sobre a fisiopatologia da SPCVH em animais experimentais; descoberta de drogas antivirais e desenvolvimento de vacinas anti-hantavirus.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Isolar Hantavírus que ocorrem no Sudeste brasileiro, incluindo o vírus Araraquara.

Objetivos específicos:

- Isolar Hantavírus em cultura de células VERO E6 (rim de macaco verde africano) e A549 (carcinoma de pulmão humano)
- Confirmar o isolamento por imunofluorescência, RT-PCR e *Western-blot*.
- Quantificar vírus eventualmente isolados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos para isolamento de Hantavírus foram realizados em laboratório de nível de biossegurança 3 (NB3), no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP – USP) nº 184/2015.

4.1. Materiais para isolamento viral

As amostras utilizadas para isolamento viral incluíram: tecidos e excretas de roedores selvagens e de morcegos, coletadas pelo Dr. Gilberto Sabino-Santos Jr e que tiveram a presença do Hantavírus Araraquara confirmada previamente por RT-PCR. Para uma das amostras de roedor silvestre e duas de morcegos foi realizado o sequenciamento nucleotídico do *amplicon*, que apresentou sequências compatíveis com o Hantavírus Araraquara. Estes tecidos, que pertencem a espécimes de *Necromys lasiurus*, *Carollia perspicillata* e *Desmodus rotundus*, foram armazenados em meio de congelamento viral, composto de Meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino + 15% de glicerol + 1% de antibiótico e antimicótico., a -80 °C. Para o isolamento, os tecidos foram adicionados a microtubos de 2mL contendo DMEM (pH 7,2) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% de antibiótico/antimicótico e submetidos, por 5 minutos, a misturador mecânico, para homogeneização. O homogeneizado foi centrifugado e o sobrenadante, utilizado para isolamento.

4.2. Cultura celular

Os fluidos utilizados para isolamento de Hantavírus foram inoculados em cultura de células VERO E6, células de rim de macaco verde africano, e células A549, células de carcinoma de pulmão humano. As células foram mantidas em DMEM (Cultilab®) acrescido de antibióticos e suplementado com soro fetal bovino - SFB (Cultilab®) na proporção de 5%, para promoção do crescimento e manutenção da linhagem celular. As células foram incubadas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂ (FRESHNEY, 1999). Para obtenção de subculturas celulares, manutenção das células e realização dos experimentos, utilizamos a tripsina como agente dissociante.

4.3. Isolamento viral

Para o isolamento viral, 10^4 células foram adicionadas a lamínulas circulares de vidro em poços de placa de cultura de 24 poços. Em seguida, adicionaram-se 100µL do fluido de onde seria isolado o vírus ou do controle positivo, o Hantavírus Rio Mamoré. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C e posteriormente, adicionou-se meio DMEM suplementado com 5% de SFB, incubando-se em estufa a 37°C.

4.4. Confirmação de isolamento viral

Após 4 dias, o sobrenadante das culturas celulares inoculadas foi colhido e as células fixadas para imunofluorescência. Sobrenadantes de cultura celular foram testados para confirmação de isolamento viral por RT-PCR e quantificação do isolado. As células foram submetidas a teste de imunofluorescência (VAPALATHI et al., 1996, 1999).

4.4.1 Teste de imunofluorescência indireta (IFA)

Para confirmar isolamento, realizou-se teste de imunofluorescência indireta (IFA) buscando por antígenos de Hantavírus nas culturas celulares inoculadas. Para tanto, células inoculadas foram semeadas sobre lamínulas de vidro, em placas de 24 poços. Como controle negativo utilizaram-se células não inoculadas. Após 4 dias, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos e lavadas com PBS. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com triton 100X 0,1% para permeabilizarão celular e bloqueadas com gelatina porcina, por 30 minutos. Em seguida adicionou-se anticorpo monoclonal anti-proteína N de Hantavírus (mAb 34757 - abcam) e as lamínulas foram incubadas por 30 minutos, a 37°C. Novamente, as lamínulas foram lavadas com PBS, e a elas adicionou-se conjugado equino anti-mouse IgG (H+L) Alexa fluor 488 (LIFE), sendo incubadas por 30 min, a 37°C e em seguida lavadas com PBS. Finalmente, as lâminulas de vidro foram montadas em lâminas com Glicerol-PBS (9:1) e observadas ao microscópio de fluorescência (Nikon 120, Japão). Antígenos de Hantavírus foram visualizados, à luz UV, fluorescendo em verde no citoplasma das células infectadas (LeDUC et al., 1985).

4.4.2. RT-PCR

Também, visando a confirmar o isolamento de Hantavírus, testou-se por RT-PCR o sobrenadante das culturas celulares inoculadas, seguindo método desenvolvido por Moreli e colaboradores (2004).

Utilizou-se o *kit* QIAamp® Viral RNA extraction (Qiagen, Alemanha) para extração de RNAs dos fluidos sobrenadantes de cultura celular, bem como do macerado de órgãos dos animais infectados. Para tanto, 140 µL dos fluidos foram depositados em micro tubo de 1,5 mL onde foram processados seguindo protocolo do fabricante. O RNA extraído foi eluído em 60 µL de água destilada livre de RNase (Invitrogen Tech-LineSM, EUA) e em seguida, submetido a transcrição reversa com *primers* randômicos.

Para a reação de transcrição reversa (RT) foi preparada mistura de 20 µL, contendo 6 µL do RNA produto da extração, 1 µL de primer randômico à 3 µM (Invitrogen, EUA) e 1 µL dos deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) à 10 mM. A mistura foi aquecida a 65 °C, por 5 min, para desnaturação das fitas de RNA e imediatamente transferida para uma cuba de gelo, por 2 min. Em seguida, adicionou-se uma outra mistura contendo 4 µL da solução tampão 5 vezes concentrada (contendo 10 mM de Tris pH 8.9, 1.5 mM MgCl₂, 80 mM KCl), 2 µL de DTT (Invitrogen, EUA) à 0.1 M e 1 µL de inibidor de RNase (Invitrogen, EUA), seguido de incubação a 37 °C, por 2 min. Posteriormente, transferiu-se a mistura para cuba com gelo onde adicionou-se 10 U de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, EUA) seguida de incubação a 25 °C, por 10 min, 50 °C, por 50 min e 70 °C, por 15 min. O DNA complementar (cDNA) assim obtido foi utilizado na PCR (MORELI et al., 2004).

Para a reação em cadeia pela polimerase (PCR) dos cDNAs utilizaram-se *primers* que amplificam sequências genômicas de Hantavírus específicas dos segmentos S e M, respectivamente no gene codificador da proteína N gene codificador da glicoproteína Gn (vide **Tabela 1**).

Tabela 1. *Primers* utilizados na RT-PCR para Hantavírus (Moreli et al 2004).

Nome	Orientação	Sequência Nucleotídica (5' – 3')	Gene	Localização
SAHN – F	Forward	CAAAACCAGTTGATCAACAGGG	N	213 a 235
SAHN – R	Reverse	GATGAATCATCCTTGAACCTTAT	N	455 a 477
HGn – F	Forward	GGGCAGTAAGTGCTGAAAC	Gn	1301 a 1324
HGn – R	Reverse	ACATTTAGCAGTTTGCCATGGG	Gn	1602 a 1625

Para a PCR, preparou-se mistura de 50 µL contendo 0,3 µM dos pares de *primers* (SAHN-F e SAHN-R, HGn-F e HGn-R), 2,5 mM dos deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 3,5 µL do cDNA obtido resultante da RT e 5 µL da solução tampão 10 vezes concentrada contendo 10 mM Tris pH 8.9, 2.5 mM MgCl₂, 80 mM KCl. Em seguida, adicionou-se 1.5 U

da Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA). Tubos com as misturas foram colocados em equipamento MJ PTC-200 (MJ Research, EUA) e submetidos a 35 ciclos térmicos de 95 °C, por 30 segundos (seg), 54 °C por 1 min e 72 °C por 180 seg. Ao final, manteve-se a temperatura de 72 °C, por 15 min, para extensão final das fitas de DNA. Os produtos da PCR (*amplicons*) em volume de 8 µl, foram visualizados sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose a 1,8 % (m/v), em solução tampão TAE (1X) corada por solução GelRed (BioTium, EUA) a 1,5 µg/mL. Avaliou-se o tamanho dos *amplicons* por comparação com marcador tipo escada de 100 pb (Fermentas, EUA) (MORELI et al., 2004).

4.4.3. *Imunoblot*

Para detecção de antígeno viral no sobrenadante de cultura celular dos possíveis isolados virais foi realizado a técnica de imonoblot.

Sobrenadante de cultura de células VERO E6 foram incubadas em solução tampão de carregamento (composta de azul de bromofenol 0,1%, EDTA 5mM, Tris-HCl H 8.8, 200mM, sucrose 1M), suplementado com SDS10% e DTT 1M e aquecidas a 95°C por 5 minutos. A separação de proteínas foi realizada por SDS-PAGE sob condições desnaturantes e redutoras, utilizando gel de poliacrilamida 10% Tris-HCl 3M (pH 8.8), SDS 10%, TEMED, persulfato de amônia (APS) 10%, e gel de empilhamento, composto de acrilamida 30%, Tris-HCl pH 6,8; SDS 10%, TEMED e APS 10%. Após o término da eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose por 1 hora a 360 mA, em tampão de transferência (25mM Trizma® base, 190mM Glicina em 10% v/v de Metanol).

O gel contendo as proteínas recém-transferidas foram incubados com solução de Ponceau por 2 minutos e lavado 3 vezes com PBS, permitindo visualização das proteínas transferidas. Posteriormente a membrana foi lavada com PBS + Tween 20 na concentração de 0,1% (PBS-T) e incubada em solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado) por 1 hora, em agitação constante. O passo seguinte foi a lavagem da membrana, 2 vezes com PBS-T e 1 vez com PBS, seguida da adição de anticorpo primário, um fluido ascítico murino hiper imune (*mouse immune ascitic fluid* - MIAF) anti-proteína N recombinante de ARQV, em solução de BSA 1% em PBS. Em seguida a membrana foi novamente lavada para incubação com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 45 minutos, sob agitação constante. Por fim a membrana foi novamente lavada. Para revelação a membrana foi incubada com solução ELC (0,1 M Tris-HCl pH 8.5, 1,25 mM Luminol, 0,2 mM de ácido cumárico, 0,02% de H₂O₂),

com subsequente captação do sinal de luminiscência no aparelho *ChemiDoc* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA).

4.5. Quantificação de Hantavírus por contagem de *microplaques*

Células VERO E6 (2×10^5 células/mL) foram cultivadas em placas de 24 poços, com DEMEM, suplementado com 5% de SFB e incubadas a 37°C. Após confluência, as monocamadas celulares foram lavadas com PBS e inoculadas com 150 µL das amostras infectadas, em diluições decimais com DEMEM (10^{-1} a 10^{-8}). As placas foram incubadas a 37°C, sendo agitadas cuidadosamente a cada 15 min para melhor distribuição da suspensão viral. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada e adicionaram-se a cada poço, 1000 µL de uma solução de carboximetilcelulose (CMC), sendo esta composta de carboximetilcelulose e meio DEMEM 2 vezes concentrado, em partes iguais, suplementado com 2% de SFB e 0,6% de dimetil sulfoxido (DMSO). As placas foram novamente incubadas, por 4 dias, tempo suficiente para a formação de microplaques, neste momento, o sobrenadante semi-sólido foi removido e adicionaram-se 3mL de formalina (solução líquida constituída por formaldeído, também denominada formol) a cada poço, incubando-se por 1 hora, a temperatura ambiente. Em seguida, removeu-se a formalina por inversão vigorosa da placa, e esta foi lavada em água corrente. Ao final, as células foram coradas com preto de naftaleno, incubando-se por 1 hora, a temperatura ambiente. Após este tempo, o corante foi aspirado e as placas lavadas 1 vez com água e secas à temperatura ambiente. Ao final do processo, os microplaques (áreas circulares com ausência de células) foram observados e contados em microscópio estereoscópico. A quantificação viral, em unidades formadoras de placas/mL (PFU/mL), foi calculada com base na média do número de *microplaques* na última diluição da amostra em que os mesmos puderam ser observados e contados (PÁDUA et al., 2015).

4.6. Quantificação de Hantavírus por contagem de foco-fluorescência

A quantificação de partículas virais infectantes foi realizada de duas formas diferentes, por contagem de *microplaques* e por foco-fluorescência. A foco-fluorescência é em sua maior parte bem semelhante a primeira técnica utilizada para quantificação viral. Células VERO E6 foram semeadas em placa de 24 poços contendo lamínulas circulares, 24 horas depois os isolados virais foram inoculados em diluições decimais com DEMEM (10^{-1} a 10^{-8}). A placa foi incubada por 1 hora e então adicionado a solução de CMC. Após 4 dias em estufa a 37°C a placa foi fixada e lavada. Em seguida os procedimentos realizados são os mesmos para IFA

descritos no item 4.4.1. Ao termino da IFA os *microplaques* podem ser observados e contados como foco-fluorescentes em microscópio.

5. RESULTADOS

5.1. Triagem de amostras

Primeiramente, para a escolha dos animais de cujos tecidos seria feita a tentativa de isolamento do Hantavírus, foram utilizadas amostras coletadas pelo Dr. Gilberto Sabino-Santos Jr. Estas amostras, 19 de roedores e 2 de morcegos, são citadas na **Tabela 2**. Ao serem testadas por RT-PCR, todas apresentaram amplicons compatíveis com Hantavírus, entretanto, apenas 3 delas tiveram seus *amplicons* sequenciados, a amostra 1 do roedor silvestre e as amostras 20 e 21, de morcegos (**Figura 7**). Em ambos os casos, as sequências exibiram altas homologias (99%) com a do ARQV. Destes animais sabidamente infectados, foram escolhidos os tecidos para isolamento viral.

Tabela 2: Amostras disponíveis para isolamento após RT-PCR positiva e sequenciamento.

AMOSTRAS PARA ISOLAMENTO			
Número	Espécie	PCR	Sequenciamento
1	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue e pulmão positivo	ARQV
2	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
3	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
4	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
5	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
6	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
7	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
8	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
9	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
10	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
11	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
12	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
13	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
14	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
15	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
16	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
17	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
18	<i>Necromys lasiurus</i>	Sangue positivo	-
19	<i>Akodon montensis</i>	Sangue positivo	-
20	<i>Carollia perspicillata</i>	Tecidos, fezes e urina	ARQV
21	<i>Desmodus rotundus</i>	Tecidos, fezes e urina	ARQV

5.2. Padronização da técnica para isolamento de Hantavírus

Para o isolamento de Hantavírus utilizamos inicialmente metodologia descrita por Vapalathi e colaboradores (1996, 1999), que consiste na inoculação da amostra em cultura de células VERO E6, com incubações por períodos de 14 dias ou mais e passagens sucessivas.

Entretanto, com o uso desta metodologia não se obteve sucesso no isolamento viral. Assim, buscando por melhorar o isolamento de Hantavírus, a técnica foi realizada em lamínulas contidas em placa de 24 poços. Adicionaram-se células VERO E6, em diferentes concentrações, às lamínulas de vidro e estas foram, após 1 dia, inoculadas com o Hantavírus Rio Mamoré (RIOMV). As células inoculadas foram incubadas por 2, 3, 4 e 5 dias quando pesquisou-se pelo vírus utilizando RT-PCR do sobrenadante e imunofluorescência das células aderidas à lamínula. Observou-se que 3 dias pós-inoculação, o vírus foi detectado com base em *amplicon* compatível com o genoma, obtido por RT-PCR (*amplicons* não mostrados) e por presença de antígeno hantavírico na imunofluorescência, como mostra a **Figura 7**. Estes resultados, altamente encorajadores, levaram-nos a optar por esta técnica para isolamento do Hantavírus nos animais.

Figura 7: Imunofluorescência de células VERO E6 em lamínulas de vidro, inoculadas com o Hantavírus RIOMV e controle negativo (células não infectadas), com marcação para núcleo celular com DAPI (em azul) e para proteína N do vírus (em verde). **A)** Controle negativo; **B)** Células inoculadas com RIOMV 3 dias pós-infecção

5.3. Isolamento viral

Fizemos tentativas para isolamento de Hantavírus utilizando, inicialmente, amostras oriundas dos órgãos do *Necromys lasiurus*. Constatamos que foi bem sucedido o isolamento do Hantavírus em células VERO E6 e A549, a partir do tecido cardíaco. O isolamento viral, nas 2 linhagens celulares, foi confirmado por Imunofluorescência direta com base na presença da proteína N viral no citoplasma celular, como mostram as **Figuras 8 e 9** e também, confirmamos por *imunoblot*, pela presença da proteína N nos fluidos de cultivo celular, como

mostra a **figura 10**. Finalmente, *amplicons* compatíveis com genoma de Hantavírus foram obtidos por RT-PCR dos fluidos de cultivo celular, como mostra a **Figura 11**.

Figura 8: Imunofluorescência de células A549, 4 dias após inoculação com amostra oriunda de sobrenadante de culturas de células inoculadas com lisado de coração do roedor *Necromys lasiurus*. **A)** Controle negativo, células A549 não inoculadas, não fluorescendo com a marcação para proteína N em verde; **B)** Células A549 inoculadas e fluorescendo com a marcação para proteína N em verde e para núcleo celular em azul com DAPI.

Figura 9: Imunofluorescência de células VERO E6, 4 dias após inoculadas com amostra oriunda de sobrenadante de culturas de células inoculadas com lisado de coração do roedor *Necromys lasiurus*. **A)** Controle negativo, células VERO E6 não inoculadas, não fluorescendo com a marcação para proteína N em verde; **B)** Células VERO E6 inoculadas e fluorescendo com a marcação para proteína N em verde e para núcleo celular em azul com DAPI.

Figura 10: Imunoblot dos sobrenadantes das culturas celulares Vero E6 e A549, com marcação para proteína N utilizando MIAF anti-N de Hantavírus.. Mostra a presença da proteína N de Hantavírus nas culturas celulares inoculadas com tecidos de pulmão, coração e baço.

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose a 1.8% em TAE, corada por gel red, exibindo amplicons de RT-PCR compatíveis com fragmentos dos segmentos genômicos M (gene Gn) e S (gene N) do Hantavírus em amostras oriundas de sobrenadantes de culturas de células VERO E6 e A549 inoculadas com lisado de coração do roedor. Os *amplicons* obtidos possuem ~ 324 pb para o gene Gn e ~ 264 pb para gene N. 1) Marcador do tipo escada 100pb; 2) controle negativo de VERO E6 mostrando segmento Gn; 3) controle negativo de VERO E6 mostrando segmento S; 4) controle negativo de A549 mostrando segmento Gn; 5) controle negativo de A549 mostrando segmento S; 6) coração inoculado em VERO E6 mostrando segmento Gn; 7) coração inoculado em VERO E6 mostrando segmento S; 8) coração inoculado em A549 mostrando segmento Gn; 9) coração inoculado em A549 mostrando segmento S; 10 e 12) controle positivo RIOMV mostrando segmento Gn; 11 e 13) controle positivo RIOMV 2 segmento Gn; 14) Marcador do tipo escada 100 pb

Após confirmação do isolamento viral da amostra de coração do roedor, decidiu-se avaliar a reprodutibilidade da técnica e para tanto, realizaram-se 2 novas tentativas de isolamento da mesma amostra do roedor silvestre, nas células VERO E6, abandonando o uso das células A549. Estes novos isolamentos foram testados quanto a presença de genoma viral por RT-PCR. Na **Figura 12** pode-se observar *amplicons* compatíveis com genoma de Hantavírus, genes de Gn e N oriundos dos três isolamentos realizados e desta forma, comprovando o sucesso no isolamento viral. Portanto, a metodologia de isolamento para Hantavírus por nós utilizada mostrou-se eficiente e reprodutível.

Figura 12: Eletroforese em gel de agarose a 1.8% em TAE, corada por gel red, exibindo amplicons de RT-PCR compatíveis com fragmentos dos segmentos genômicos M (gene Gn) e S (gene N) do Hantavírus em amostras oriundas de sobrenadente de culturas de células VERO E6 inoculadas com lisado do coração do roedor, em três repetições do isolamento viral. Os *amplicons* possuem ~ 324 pb para o gene Gn e ~ 264 pb do gene N. 1) Marcador do tipo escada com 100pb 2) controle negativo para segmento Gn; 3) controle negativo para segmento S; 4) coração inoculado em VERO E6, 1º isolamento, mostrando segmento Gn; 5) coração inoculado em VERO E6, 1º isolamento, mostrando segmento S; 6) coração inoculado em VERO E6, 2º isolamento, mostrando segmento Gn; 7) coração inoculado em VERO E6, 2º isolamento, mostrando segmento S; 8) coração inoculado em VERO E6, 3º isolamento, mostrando segmento Gn; 9) coração inoculado em VERO E6, 3º isolamento, mostrando segmento S; 10) Controle positivo RIOMV mostrando segmento Gn; 11) Controle positivo RIOMV mostrando segmento N.

Em continuação, tentamos o isolamento viral a partir da amostra de morcego *Desmodus rotundus*. Previamente, avaliamos a presença do genoma viral em tecidos do animal (baço, coração, pulmão, fígado e rim) por RT-PCR. Nestes tecidos observamos *amplicons* compatíveis com genoma de Hantavírus em baço, coração, pulmão e rim, porém não em fígado, como mostramos na **Figura 13**.

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose a 1.8% em TAE, corada por gel red, exibindo amplicons de RT-PCR compatíveis com fragmentos dos segmentos genômicos M (gene Gn) e S (gene N) do Hantavírus oriundos de tecidos do morcego. Os *amplicons* possuem ~ 324 pb para o gene Gn e ~ 264 pb do gene N. 1) Marcador tipo escada 100pb; 2) controle negativo para segmento Gn; 3) controle negativo para segmento S; 4) baço inoculado em VERO E6 mostrando segmento Gn; 5) baço

inoculado em VERO E6 mostrando segmento S; 6) coração inoculado em VERO E6 para segmento Gn; 7) coração inoculado em VERO E6 para segmento S; 8) fígado inoculado em VERO E6 não mostrando segmento Gn; 9) fígado inoculado em VERO E6 não mostrando segmento S; 10) pulmão inoculado em VERO E6 mostrando segmento Gn; 11) pulmão inoculado em VERO E6 mostrando segmento S; 12) rim inoculado em VERO E6 mostrando segmento Gn; 13) rim inoculado em VERO E6 mostrando segmento S; 14 e 16) controle positivo RIOMV mostrando segmento Gn; 15 e 17) controle positivo RIOMV mostrando segmento N.

Desta forma, baço, coração, pulmão e rim do morcego foram utilizados na tentativa de isolamento viral. Para este isolamento inocularam-se sobrenadantes de lisado dos tecidos, em cultura de células VERO E6 e incubou-se por 4 dias a 37 °C. A ausência de *amplicons* compatíveis com genoma de Hantavírus mostra que as tentativas de isolamento não foram bem sucedidas, como mostra a **Figura 14**.

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose a 1.8% em TAE, corada por gel red, exibindo amplicons de RT-PCR compatíveis com fragmentos dos segmentos genômicos M (gene Gn) e S (gene N) do Hantavírus oriundas de sobrenadantes de culturas de células VERO E6 inoculadas com tecidos e urina do morcego. Os *amplicons* possuem ~ 324 pb para o gene Gn e ~ 264 pb do gene N 1) Marcador tipo escada 100pb; 2) controle negativo para segmento Gn; 3) controle negativo para segmento S; 4) baço inoculado em VERO E6 para segmento Gn; 5) baço inoculado em VERO E6 para segmento S; 6) coração inoculado em VERO E6 para segmento Gn; 7) coração inoculado em VERO E6 para segmento S; 8) fígado inoculado em VERO E6 para segmento Gn; 9) fígado inoculado em VERO E6 para segmento S; 10) pulmão inoculado em VERO E6 para segmento Gn; 11) pulmão inoculado em VERO E6 para segmento S; 12) rim inoculado em VERO E6 para segmento Gn; 13) rim inoculado em VERO E6 para segmento S; 14) urina inoculado em VERO E6 para segmento Gn; 15) urina inoculado em VERO E6 para segmento S; 16) controle positivo RIOMV mostrando segmento Gn; 17) controle positivo RIOMV mostrando segmento S. Todos os tecidos de morcego foram negativos.

5.4. Quantificação do Hantavírus isolado

Para quantificação, submeteram-se os vírus isolados à técnica por contagem de microplaqes (PADUA et al., 2015), e também, por foco-fluorescência (PAYNE et al., 2006). Entretanto, com base nas 2 técnicas, não obtivemos sucesso na quantificação viral, pois os vírus isolados não infectaram as células utilizadas nos procedimentos.

6. DISCUSSÃO

São conhecidos mais de 80 animais-reservatório de Hantavírus. Destes 51 são roedores, 7 são morcegos, 20 toupeiras e musaranhos (Oliveira et al., 2014). Hantavírus foram identificados em 12 diferentes espécies de roedores, dos gêneros *Akodon* sp., *Calomys* sp., *Holochilus* sp., *Oligoryzomys* sp., *Oxymycterus* sp., *Necromys* sp. e *Rattus* sp.. No Brasil, a enorme diversidade de roedores, considerada a maior do mundo, faz pressentir uma grande quantidade de Hantavírus que precisam ser reconhecidos. Hantavírus são mantidos na natureza nestes animais reservatórios e sua transmissão, intra e entre espécies, ocorre por inalação de aerossóis de excretas infectadas, ou por arranhadura e mordedura. Infecção por Hantavírus em roedores diferentes dos hospedeiros primários, ou seja, transmissão entre espécies também tem sido relatada, e esses eventos são conhecidos como *spillover* (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010; SOUZA, et al., 2016). Com o *spillover*, o número de possíveis reservatórios para manutenção e propagação viral é ampliado e intensificado. Com o crescente aumento da degradação ambiental e modificação dos *habitats* naturais, ocorre forçada modificação comportamental dos animais-reservatório, o que os leva a contato mais íntimo entre si e com os seres humanos (SABINO-SANTOS Jr et al., 2015).

O vírus Araraquara (ARQV), de ocorrência nas regiões de Cerrado do Sudeste e Planalto Central brasileiro, é o *Hantaviridae* de maior letalidade dentre todos os patógenos desta família, matando cerca de 50% dos pacientes com SPCVH (FIGUEIREDO, L. T. M. et al., 2009; FIGUEIREDO, G. G. 2010). Assim, centenas de pacientes tem morrido em consequência da grave doença produzida por este vírus nas regiões supra citadas. Entretanto, o isolamento do ARQV, de grande importância para futuros estudos, ainda não havia sido realizado.

Isolamentos de Hantavírus tem sido tradicionalmente descritos como resultado de procedimentos laboriosos e de forma geral, são realizados em culturas de células VERO E6, escolha justificada por três importastes características destas células, (1) são permissivas a infecção por grande variedade de vírus, já que expressam grande repertório de receptores, (2) a linhagem celular apresenta remoção genética do *locus* do interferon tipo I (IFN I), com sua deficiente produção, assim como (3) o fator de regulação IRF3 destas células é ineficiente (PRESCOTT, et al., 2010). Contudo alguns isolamentos de Hantavírus foram realizados em culturas de células primárias dos tecidos de animais-reservatório (SANADA et al., 2012). Outra forma utilizada para isolamento é a inoculação em animais, sendo estes, em sua maioria, os próprios animais-reservatório (VAPALAHTI et al., 1999).

Como já mencionado, a cultura celular mais utilizada para isolamento de Hantavírus é a de células VERO E6, deficiente na produção de interferon do tipo I (PRESCOTT, et al., 2010). Nestas tentativas de isolamento de Hantavírus faziam-se passagens das células inoculadas sucessivamente para obtenção de células infectadas e teores virais adequados à detecção e confirmação do isolamento. Citamos aqui vários trabalhos mostrando este laborioso processo utilizado no isolamento de Hantavírus: Vapalathi e colaboradores (1996, 1999), Diglisic e colaboradores (1994), Nemirov e colaboradores (1999), Powers e colaboradores (1999), Papa e colaboradores (2001), Galeno e colaboradores (2002), Schmaljhon e colaboradores (1995), Jameson e colaboradores (2012), Sanada e colaboradores (2012), Dzagurova e colaboradores (2015).

Nosso trabalho, por ter sido bem sucedido no isolamento de Hantavírus, corrobora a utilidade destas células, entretanto, a nossa técnica, utilizando as mesmas células VERO-E6 e adicionalmente células A549, não contradiz a ideia de que o isolamento de Hantavírus é difícil e laborioso, ainda que realizado em menos tempo. Em verdade, é possível que essa recorrente dificuldade no isolamento, seja devida ao fato de que passagens sucessivas do vírus a ser isolado em cultura de células prejudiquem sua capacidade de infectividade, como ao infectar animais-reservatório ou produzir doença em outros animais, como primatas não humanos (Fulhorst et al., 1997). Nemirov e colaboradores (2003) descrevem mutações pontuais em gene do nucleocapsídeo e polimerase de Hantavírus, as quais estariam relacionadas a sua adaptação às células VERO E6. Assim, passagens sucessivas do vírus em cultura de células poderiam levar à sua adaptação às mesmas com perda de eficiência na infecção de outros organismos. Tal fato estaria associado a: (1) acúmulo de mutações que poderia limitar infectividade; (2) a troca de função de receptores de reconhecimento do vírus, que estão intimamente relacionados a patogenicidade viral poderia atuar, também, limitando a infectividade; (3) a sensibilidade à temperatura, um fator de pressão seletiva, poderia atuar na infectividade dos Hantavírus (PRESCOTT et al., 2017). Ainda, autores referem a perda do vírus isolado após sucessivas passagens em cultura celular. Portanto, vemos como um freio útil das alterações virais associadas à redução de infectividade, passagens do Hantavírus em animal-reservatório e obtenção de estoque viral oriundo desses animais, evitando a atenuação indesejável das passagens sucessivas em cultura de células.

Ainda deve-se considerar que possa ocorrer a produção de IFN do tipo III em infecções por Hantavírus, como apresentado por Prescott e colaboradores (2010), mostrando células VERO E6 expressando IFN λ em resposta a infecções por diferentes Hantavírus, SNV, PHV e ANDV. Portanto, ainda que esta resposta seja adiada pela fraca resposta IRF3 e falta de genes

de IFN I, a expressão de IFN III induz um estado antiviral que pode interferir na qualidade e na quantidade de estoques virais gerados. Assim, Prescott e colaboradores (2010) mostram que a interrupção desta resposta pode contribuir para o aumento da eficiência no preparo de estoques virais.

Historicamente roedores silvestres são considerados reservatórios naturais de Hantavírus. Dos quais diversos isolamentos já foram realizados. Musaranhos, toupeiras e mais recentemente morcegos também foram associados a Hantavírus. Até 2012 havia apenas um relato de Hantavírus em morcegos, Kim e colaboradores (1994) isolaram o Hantavírus patogênico Hantaan na Coreia, do pulmão de morcegos, *Eptesicus serotinus* e *Rhinolophus ferrum-equinum*. Relatos posteriores, mostram isolamentos de Hantavírus não relacionados a doença humana. Porém, recentemente observaram-se evidências de infecção pelo Hantavírus ARQV em morcegos (DE ARAUJO et al., 2012; SABINO-SANTOS Jr et al., 2015). Sabino-Santos Jr e colaboradores (2017, no prelo) identificaram parte do segmento S de Hantavírus em diferentes tecidos dos morcegos *Carollia perspicillata* e *Desmodus rotundus*, tendo estas sequências alta similaridade com o genoma do Hantavírus Araraquara.

A presença de genoma viral, semelhante ao vírus Araraquara, em tecidos de morcego *Desmodus rotundus* indica suscetibilidade à infecção pelo vírus e possível participação no ciclo de manutenção viral, ainda que se faça necessário confirmar partículas virais infectantes em suas excretas. A participação deste espécime como animal reservatório para o vírus Araraquara pode levar a novas possibilidades no ciclo de manutenção viral e no contágio humano. Portanto, reconhecendo genoma de Hantavírus em tecidos de morcego *Desmodus rotundus*, realizamos tentativa de isolamento a partir de amostras desta espécie. Para tanto, utilizamos sobrenadante do lisado de tecidos em células VERO E6. A metodologia utilizada foi similar a aquela utilizada para a amostra bem sucedida de roedor silvestre, inclusive com tempo de cultura de 4 dias, mais curto que o convencional. Entretanto, ainda que tenhamos obtido sucesso no isolamento com amostra de roedor silvestre o mesmo não ocorreu com os tecidos do morcego. Assim como a maioria dos isolamentos de Hantavírus com morcegos, aqueles previamente notificados por outros autores utilizaram períodos de cultura mais longos. Como, Kim e colaboradores (1994), que utilizaram cultura de células VERO E6, com êxito após sucessivas passagens cegas de 14 dias, sendo os vírus identificados com 45-75 dias após inoculação. No presente trabalho, apesar dos resultados negativos obtidos até então, pretendemos tentar novamente com os mesmos tecidos de morcegos que produziram *amplicons* virais em RT-PCR. Nestas tentativas, experimentaremos o isolamento em cultura celular oriunda de morcego, Eidini/41 (célula de rim do morcego *Eidolon helvum*).

Chamou atenção no presente trabalho que, nosso isolamento bem sucedido de Hantavírus foi feito de forma muito mais simples que os previamente divulgados, que recorreram a longas e sucessivas passagens. Da mesma forma, 2 isolamentos prévios de Hantavírus utilizaram método simplificado. Sanada e colaboradores (2012) utilizaram a linhagem celular MRK101, de célula de rim de *Myodes rufocanus*, reservatório natural de Hantavírus, e células VERO E6 para a tentativa de isolamento. Neste trabalho, após 5 dias de cultura, proteína N do vírus Puumala foi detectada na cultura de células MRK101, e o mesmo, após 10 dias, em células VERO E6. No mesmo trabalho, vírus Hantaan em células VERO E6 permitiu detectar proteína N após 5 dias de cultura, com pico de título viral no 7º dia. Também, Powers e colaboradores (1999), encontraram células positivas para presença de antígeno viral, Rio mamoré após 14 dias pós inoculação. Portanto, ainda que usualmente sejam necessários maior número de passagens, inclusive para o vírus Andes, mais próximo ao Araraquara, existem casos nos quais, em período curto de cultivo o Hantavírus foi isolado com sucesso. Nosso isolamento foi realizado com sucesso logo em primeira passagem, sendo esta de apenas 4 dias. Esta seria uma alternativa metodológica que simplifica sobremaneira os procedimentos. Quanto ao histórico de tentativas de isolamento para Hantavírus em nosso laboratório utilizando a técnica convencional, quando bem sucedido, houve rápida perda do isolado nas próximas passagens em cultivo celular.

São fatores negativos do presente trabalho não conseguirmos quantificar ou sequenciar o único Hantavírus isolado. A quantificação de partículas virais infectantes não foi realizada com sucesso, nem por quantificação de *microplaques*, nem por focufluorescencia. Provavelmente, isto se deveu à grande redução nos teores virais consequente à passagem em células VERO E6, necessária ao procedimento de quantificação, mas que caracteriza uma nova passagem. Haveria necessidade de uma passagem prévia do Hantavírus isolado no animal-reservatório, para elevar seus teores. Ainda, outro aspecto negativo, não foi possível isolar o Hantavírus de morcego.

Em suma, neste trabalho, detectamos genoma de Hantavírus em tecidos de roedores silvestres da espécie *Necromys lasiurus*, reservatório natural do Hantavírus Araraquara e em tecidos de morcego *Desmodus rotundus*. Por fim, isolamos Hantavírus a partir de sobrenadante de lisado do coração de um espécime de roedor silvestre, o que foi confirmado pela presença do genoma viral do isolado em sobrenadante de cultura celular e seus antígenos por imunofluorescência indireta. O processo de isolamento mostrou-se reprodutível, por 3 vezes, quando utilizamos os mesmos tecidos do roedor. Portanto, nossos resultados encorajam que a metodologia para isolamento de Hantavírus aqui utilizada, num trabalho-piloto, deva ser

experimentada e avaliada por mais vezes. Provavelmente, isolamos ARQV, o mais virulento dentre todos os Hantavírus. Este isolado, deverá fornecer importantes informações sobre seu genoma completo, além de propiciar vários estudos futuros.

7. CONCLUSÃO

- Um Hantavírus foi isolado do tecido cardíaco de um roedor *Necromys lasiurus* utilizando células Vero-E6 incubadas por 4 dias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALKAN, C. et al. Isolation, Genetic Characterization, and Seroprevalence of Adana Virus, a Novel Phlebovirus Belonging to the Salehabad Virus Complex, in Turkey. *Journal of Virology*. v. 89, 2015.
- ARAI, S. et al. Hantavirus in northern short-tailed shrew, United States. *Emerging Infectious Diseases*. v. 13, n. 9, p. 1420-1423, 2007.
- ARAI, S. et al. Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). *PNAS*. v. 105, n. 42, 2008.
- BRASIL. Ministério da saúde. Doenças infecciosas e parasitárias guia de bolso. 8a edição revista. 2010
- BRASIL. Casos confirmados de Hantavirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1993 a 1993. **Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde**. 2014a. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/16/CASOS-CONF-HANTAVIROSE.pdf%20%20anexo%20I.pdf> >. Acesso em: 13. Abril de 2015.
- BRASIL. Óbitos de Hantavirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas: 1993 a 2014. **Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde**. 2014b. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/images/PDF/2014/dezembro/16/--BITOS-POR-HANTAVIROSE.%20_anexo%20II.PDF>. Acesso em: 13. Abril de 2015.
- BROWER, J. E.; ZAR, J. H.; VON ENDE C. Field and laboratory methods for general ecology, 4th ed. McGraw–Hill, New York, 273, 1998.
- CAMPOS, G. M. Estudo clínico-epidemiológico sobre a hantavirose na região de Ribeirão Preto, SP. **Dissertação de mestrado**, Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, SP. 2012.
- CHILDS, J. E.; et al. Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as the primary rodent reservoir for a new Hantavírus in the southwestern United States. *J Infect Dis*. v. 169, p. 1271-1280. 1994.
- CLEMENT, J.; et al. A unifying hypothesis and a single name for a complex globally emerging infection: Hantavírus disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis*. v.21, p. 1-5. 2012.
- CLEMENT, J.; MAES, P.; RANST, M. V. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the new, and Hantavírus Pulmonary Syndrome in the old world: Paradi(se)gm lost regained? *Virus Research*. 2014.

- CROSS, R. W.; et al. Old World Hantaviruses in Rodents in New Orleans, Louisiana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 90, n. 5), p. 897–901, 2014.
- DA SILVA, M. V.; et al. Hantavirus Pulmonary Syndrome: Report of the first three cases in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop.* Sao Paulo 39: 231-234. 1997.
- DE ARAUJO, J.; et al. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. *BMC Research Notes.* V. 5, n.1, p. 690, 2012.
- DEARING, M. D.; DIZNEY, L. Ecology of hantavirus in a changing world. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* v. 1195, p. 99–112. 2010.
- DIGLISIC, G.; et al. Isolation of a Puumala-like Virus from *Mus musculus* Captured in Yugoslavia and Its Association with Severe Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Medical Research Institute of Infectious Diseases.* Chicago, v. 169, p. 204-207, 1994.
- DZAGUROVA, T. K.; et al. Isolation of Sochi Virus From a Fatal Case of Hantavirus Disease With Fulminant Clinical Course. *Clinical Infectious Disease* .v. 54, n. 1, p. 1-4, 2012.
- ELLIOTT, R. M. Nucleotide sequence analysis of the small (S) RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. *J Gen Virol* 70: 1280-1285, 1989a.
- ELLIOTT, R. M. Nucleotide sequence analysis of the large (L) genomic RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. *Virology* 173: 426- 436, 1989b.
- ELLIOTT, R M; SHMALJOHN, C. S. BUNYAVIRIDAE. In: David M. Knipe, Peter M. Howley (Editor in chief) sixty edition vol. 1. Fields virology. . Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA 2013. Pag1244 -1282
- FIGUEIREDO, L. T. M. et al. Hantavirus pulmonar syndrome (HPS) in Guariba, SP, Brazil. Report of 2 cases. *Rev Inst. Med tropical.* 1999a.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; et al. Vírus brasileiros da família Bunyaviridae. *Medicina, Ribeirão Preto*, 32: 154-158, abr./jun. 1999b.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; et al. Diversity Genetic Network Consortium.. Distinct hantaviruses causing Pulmonary Syndrome in Central Plateau, Southeastern and Southern Brazil. *Emerg Infect Dis.* 15(4): 561-7, 2009.

- FIGUEIREDO, G. G.; et al. Diagnosis of human and rodent infections by hantavirus in Ribeirão Preto, Brazil. *Rev Soc Brasil Med Trop*. V. 43, n. 4, p. 348-354, 2010.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; et al. Hantaviruses and cardiopulmonar syndrome in South America. *Virus Research*. v. 187, p.43-54, 2014.
- FIRTH, C.; et al. Diversity and Distribution of Hantaviruses in South America. *J. Virol*. v.86, n. 24, p. 13756–13766. 2012.
- FULHORST, C. F.; et al. Isolation, Delgadito characterization and geographic distribution of Carlo virus, a newly discovered South American hantavirus (family Bunyaviridae). *Virus Research*. v. 51, n. 2, p. 159-171. 1997.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells**. A Multimedia Guide. Wiley-Liss, 1999.
- GALENO, H.; et al. First Human Isolate of Hantavirus (Andes virus) in the Americas. *Emerging Infectious Diseases*. v. 8, n. 7, p. 657-661. 2002.
- GUINDON, S.; et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*. v. 59(3). p.307-21. 2010.
- GUO, W-P. et al. Phylogeny and Origins of Hantaviruses Harbored by Bats, Insectivores, and Rodents. *PLoS Pathog* . v. 9, n.2, p. 1-13, 2013
- HJELLE, B. Hantaviruses: Clinical, Microbiologic, and Epidemiologic Aspects *Critical Reviews in Clinical Laboruroy Sciences*, v. 32, n. 5, p. 469-508, 1995.
- HJELLE, B.; TORRES-PÉREZ, F. Hantaviruses in the Americas and Their Role as Emerging Pathogens. *Viruses*. v. 2, n.12, p. 2559-2586. 2010.
- ICTV Master Species List 2015 v1. Disponível em <<https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/5945>>. Acessado 01 de Maio de 2017
- ICTV Master Species List 2016 v1.1. Disponível em <<https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/6776>>. Acessado 01 de Maio de 2017.
- JAMESON, L. J.; et al. The continued emergence of hantaviruses: isolation of a Seoul virus implicated in human disease, United Kingdom, October 2012. *Euro Surveill*. V.18, n.1, p. 1-4, 2013.
- JOHNSON, A. M. et al. Genetic Investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. *Journal of Medical Virology*. v. 59, n.4, p. 527-535, 1999.

- JONSSON, C. B.; FIGUEIREDO, L. T. M.; VAPALAHTI, O. A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 2, p. 412–441, 2010.
- KARIWA, H et al. Isolation and Characterization of Hantaviruses in Far East Russia and Etiology of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in the Region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 86, n.3, p. 545–553, 2012.
- KIM, G. R.; LEE, Y. T.; PARK, C. H. A new natural reservoir of hantavirus: isolation of hantaviruses from lung tissues of bats. *Arch Virol.* v. 134, p. 85-95. 1994
- KLEMPA, B.; et al., Central European Dobrava Hantavirus Isolate from a Striped Field Mouse (*Apodemus agrarius*). *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 6, p. 2756–2763. 2005.
- KRÜGER, D. H.; SHÖNRICH, G; KLEMPA, B. Human pathogenic hantaviruses and prevention of infection. *Human Vaccines*. v. 7 , n.6, p. 685-693. 2011.
- KRÜGER, D. H.; et al. Hantaviruses-Globally emerging pathogens. *J Clin Virol*, 2014.
- LeDUC, J. W.; et al. Isolation of a hantaan-related virus from brazilian rats and serologic evidence of its widespread distribution in south américa. *Am. I. Trop. MeL Hyg.* v. 34(4), p. 810-815 1985.
- LEE , H. W; LEE, P. W; JHONSON, K. M. Isolation of the Etiologic Agent of Korean Hemorrhagic Fever. *The journal of infectious diseases*. v. 137, n.3, p. 298-308, 1978.
- LI, J. L. et al. An Efficiente Method for Isolation of hantaan virus trough Serial Passagens in Suckling Mice. *Intervirology*. v.56, n. 3, p. 172-177, 2013.
- LOPEZ, N. Genetic Identification of a New Hantavirus Causing Severe Pulmonary Syndrome in Argentina. *Virology*. v. 200, p. 223-226, 1996.
- LUNDKVIST, A.; et al. Isolation and characterization of Puumala hantavirus from Norway: evidence for a distinct phylogenetic sublineage. *Journal of General Virology*. v. 79, n. 11, p. 2603–2614. 1998.
- Mills, J. N.; et al. Guidelines for working with rodents potentialy infected with hantavirus. *J Mammal*. v. 76, p. 716-722, 1995.

- MORELI, M. L.; DE SOUSA, R. L. M.; FIGUEIREDO, L. T. M. Detection of Brazilian Hantavirus by RTPCR amplification of N gene with patients with Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. *Mem Inst Osw Cruz*. v. 99, p. 633-638. 2004.
- NEMIROV, K.; et al. Isolation and characterization of Dobrava hantavirus carried by the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Estonia. *Journal of General Virology*. v. 80, p. 371–379. 1999.
- NEMIROV, K. et al. Adaptation of Puumala Hantavirus to Cell Culture Is Associated with Point Mutations in the Coding Region of the L Segment and in the Noncoding Regions of the S Segment. *Journal of virology*, v. 77, n.16, p. 8793–8800, 2003.
- NICHOL, S. T.; et al. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science*. v. 262, p. 914-917. 1993.
- OLIVEIRA, R. C.; et al. Ecological study of Hantavirus infection in wild rodents in na endemic área in Brazil. *Acta Tropica*. v. 131, n. 1, p. 1-10. 2014.
- PÁDUA, M. et al . Development of a novel plaque reduction neutralisation test for hantavirus infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Online)*, v. 110, p. 624-628, 2015.
- PAPA, A. et al. Isolation of Dobrava Virus from *Apodemus flavicollis* in Greece. *Journal Of Clinical Microbiology*. v. 39, n. 6, p. 2291-2293, 2001.
- PAYNE, A. F. Quantification of flaviviruses by fluorescent focus assay. *Journal of Virological Methods*. v.134, p. 183-189, 2006.
- PETERS, C. J. Hantavirus Pulmonary Syndrome in the Americas. En: Scheld WM, Craig WA, Hughes JB, eds. *Emerging Infections 2*. Washington, DC: ASM Press; 1998.
- PINTO, V. L. P.; et al. Twenty years of hantavirus pulmonary syndrome in Brazil: a review of epidemiological and clinical aspects. *J Infect Dev Ctries*. v. 8(2), p.137-142, 2014.
- POWERS, A. M. et al. Isolation and genetic characterization of a hantavirus (bunyaviridae: hantavirus) from a rodent, *oligoryzomys microtis* (muridae), collected in northeastern peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. v. 61, n. 1, p. 92–98, 1999.
- PRESCOTT, J. et al. New World Hantaviruses Activate IFN λ Podruction in Type I IFN-Deficient Vero E6 Cells. *Plos One*. v.5, 2010.

- PRESCOTT, J.; FELDMANN, H.; SAFRONETZ, D. Amending Koch's for viral disease: When "growth in pure culture" leads to a loss virulence. *Antiviral Research*. v. 137, p. 1-5, 2017.
- RABONI, S. M.; et al. Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of Brazil: Case report. *Journal of Clinical Virology*. v. 45. p. 153-156. 2009.
- REED L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percents endpoints. *Am J Hyg*. V. 27, p. 493-497, 1938
- RODRÍGUEZ, F.; et al. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J Theor Biol*. v. 22;142(4), p. 485-501. 1990
- ROSA, E. S. T.; et al. Newly Recognized Hantaviruses Associated with Hantavirus Pulmonary Syndrome in Northern Brazil: Partial Genetic Characterization of Viruses and Serologic Implication of Likely Reservoirs. *Vector-borne and zoonotic diseases*. v. 5, n. 1, p. 11-19. 2005.
- ROSA, E. S. T.; et al. Hantaviruses and Hantavirus Pulmonary Syndrome, Maranhão, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. v. 16, n. 12, p. 1952-1955. 2010.
- ROSA, E. S. T.; et al. Molecular Epidemiology of Laguna Negra Virus, Mato Grosso State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. v. 18, n. 18. p. 982-985. 2012.
- SABINO-SANTOS Jr, G. Ecologia de Hantavírus e de ectoparasitos em pequenos mamíferos selvagens. **Tese de doutorado**, Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, SP. 2015.
- SABINO-SANTOS Jr, G. et al. Common vampire bat (Chiroptera: *Desmodus rotundus*) as potential natural-reservoir of Araraquara hantavírus. 2017. No prelo.
- SANADA, T.; et al. Isolation of Hokkaido virus, genus Hantavirus, using a newly established cell line derived from the kidney of the grey red-backed vole (*Myodes rufocanus bedfordiae*). *Journal of General Virology*. v. 93, p. 2237–224. 2012.
- SCHMALJOHN, A. L.; et al. Isolation and initial characterization of a newfound Hantavírus from California. *Virology*. v. 208, p. 963-972. 1995.
- SCHMALJOHN, C.; HJELLE, B. Hantaviruses: A Global Disease Problem. *Emerging Infectious Diseases*. v. 3, n. 2, p. 95-104. 1997.
- SONG, J-W.; et al. Thottapalayam Virus, a Prototype Shrewborne Hantavirus. *Emerging Infectious Diseases* v. 13, n. 7, p. 980-985, 2007a.

- SONG, J-W. et al. Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*). *Virology Journal*. v. 4, n. 114, p. 1-5, 2007b
- SONG, J-W. et al. Newfound Hantavirus in Chinese Mole Shrew, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases*. v. 13, n. 11, p. 1784-1787, 2007c.
- SOUZA, W.M. et al. Experimental infection of Rio Mamore hantavirus in Sigmodontinae rodents. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 111, n.6, p. 399-402, 2016.
- SUZUKI, A.; et al. Identifying Rodent Hantavirus Reservoirs, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. v. 10, n. 12, p. 2127-2134, 2004.
- TAMURA, K.; et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol* 2011.
- TAURO, L. B. et al. First isolation of Bunyamwera virus (Bunyaviridae family) from horses with neurological disease and an abortion in Argentina. *The Veterinary journal*. p.11-114, 2015.
- TRAVASSOS DA ROSA, E. S. et al. Molecular Epidemiology of Laguna Negra Virus, Mato Grosso State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. v 18, n. 6, 2012.
- VAHERI, A.; et al. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nature reviews microbiology*, v. 11, n. 8, p. 539-550, 2013.
- VAPALAHTI, O. et al. Isolation and characterization of Tula virus, a distinct serotype in the genus Hantavirus, family Bunyviridae. *Journal of General Virology*. v. 77, p. 3063-3067. 1996.
- VAPALAHTI, O. et al. Isolation and Characterization of a Hantavirus from Lemmus sibiricus: Evidence for Host Switch during Hantavirus Evolution. 1999. *Journal of General Virology*. v. 73, n. 7, p. 5586-5592. 1999.
- VAPALAHTI, O. et al. Hantavirus infections in Europe . *The Lancet Infectious Diseases*. v. 3, 2003.
- VASCONCELOS, M. I. et al., Hantavirus Pulmonary Syndrome IN THE RURAL AREA OF JUQUITIBA, SÃO PAULO METROPOLITAN AREA, BRAZIL. *Rev Inst. Med trop*. v.39, p. 237-238, 1997.

YU, X. et al. Fever with Thrombocytopenia Associated with a Novel Bunyavirus in China. *The New England Journal of Medicine*, v. 364, n. 16, p. 1523-1532, 2011.

ZELLER, H. G. et al. Electron microscopic and antigenic studies of uncharacterized viruses. II. Evidence suggesting the placement of viruses in the family Bunyaviridae. *Arch Virol.* v.108, p. 211–27. 1989,

ZHANG, Y. G.; et al. Isolation and characterization of hantavirus carried by Apodemus peninsulae in Jilin, China. *Journal of General Virology*. v. 88, n. 4, p. 1295–1301. 2007.

Zhioua, E. et al. Punique virus, a novel phlebovirus, related to sandfly fever Naples virus, isolated from sandflies collected in Tunisia. *J Gen Virol.* 2010.