Jansen de Araujo

**DETECÇÃO MOLECULAR DE HANTAVÍRUS PELA TÉCNICA DE
REAL-TIME PCR EM AMOSTRAS DE ROEDORES SILVESTRES
COLETADAS NA REGIÃO DO VALE DO RIBEIRA
NO ESTADO DE SÃO PAULO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutor em
Microbiologia.**

**São Paulo
2010**

Jansen de Araujo

**DETECÇÃO MOLECULAR DE HANTAVÍRUS PELA TÉCNICA DE
REAL-TIME PCR EM AMOSTRAS DE ROEDORES SILVESTRES
COLETADAS NA REGIÃO DO VALE DO RIBEIRA
NO ESTADO DE SÃO PAULO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon

**São Paulo
2010**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Araujo, Jansen.

Detecção molecular de Hantavírus pela técnica de Real-time PCR em amostras de roedores silvestres coletadas na região do Vale do Ribeira no Estado de São Paulo / Jansen Araujo. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Edison Luiz Durigon.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Virologia clínica e molecular.

Versão do título para o inglês: Molecular detection of Hantavirus by Real-time PCR in wild rodents collected on Vale do Ribeira region, São Paulo state.

Descritores: 1. Hantavírus 2. Roedores silvestres 3. Real-time PCR 4. SYBR Green I. Durigon, Edison Luiz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0164/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Jansen Araujo.

Título da Tese: Detecção molecular de Hantavírus pela técnica de
Real-time PCR em amostras de roedores silvestres coletadas na
região do Vale do Ribeira no Estado de São Paulo.

Orientador(a): Edison Luiz Durigon.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **088** nas fls. **34** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Edison Luiz Durigon, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "***Detecção molecular de Hantavírus pela técnica de real-time PCR em amostras de roedores silvestres coletadas na região do Vale do Ribeira no Estado de São Paulo***" do qual participou(aram) o(s) alunos **Jansen de Araújo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **21.11.2006**.

São Paulo, 22 de novembro de 2006.

Prof. Dr. UBIRATAN FABRES MACHADO
Coordenador da CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da CEEA - ICB/USP

Em especial a toda minha família (pai Araujo, minha mãe
Roseli, minhas irmãs Janine e Janiele, a minha futura
esposa Tatiana, por acreditarem no meu potencial, pelo
carinho e pelo incentivo de sempre.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Aos meus familiares, especialmente minha mãe Roseli Capuccini de Araujo, pela vida, pelo apoio e pela força nos momentos difíceis.

Ao meu Pai, Hioshijiro Araki de Araujo, pelo exemplo de seriedade em que me ensinou a conduzir a vida, e responsabilidade no trabalho.

As minhas duas irmãs Janine e Janiele, que me apoiaram em todas minhas decisões e sempre torceram pelo meu sucesso.

Aos meus queridos amigos, que nos momentos fora do trabalho, nos *happy hours*, sempre me orientaram sobre decisões e postura no rumo certo a seguir, com conselhos sempre pertinentes.

Ao médico veterinário Dr. Dalmir Ometto, meu sogro, por me acolher como um filho durante todo este período, e pelo grande amigo que conquistei.

Agradecimento especial a nossa equipe de campo (a infantaria), que contribuiu diretamente na execução deste trabalho, criada no Laboratório de Virologia clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da USP: Luciano M. Thomazelli, Carolina S. Ferreira, Renata Ferreira Hurtado, Tatiana Lopes Ometto, Felipe Alves Moraes, Luiz Francisco Sanfilippo, José Maria Lopes.

Ao Marcello Schiavo Nardi, do laboratório de Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses FMVZ-USP, pela colaboração nos trabalhos de campo, capturas e em especial pela amizade.

Alessandra Nava, consultora Senior da *EcoHealth Alliance* pela amizade e principalmente no trabalho em parceria no desenvolvimento de projetos em colaboração.

Ao Ricardo Siqueira Bovendorp, Ecólogo do Laboratório de Ecologia Animal, Depto de Ciências Biológicas, ESALQ- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP e Roberto Haddad do Instituto de Pesquisas Ecológicas- IPÊ pelo auxílio na identificação dos animais capturados.

A Caroline C. Aires do LABEC - USP/MZUSP- Museu de Zoologia da USP e Sandra Favorito da Universidade Bandeirantes de São Paulo (UNIBAN) pelo auxílio

na coleta e identificação dos roedores silvestres na região de Biritiba Mirim e Salesópolis.

A equipe do laboratório BSL3: Dyana Alves Henriques, Tatiana L. Ometto, Fabio C. Maués, Lilia M. Dutra, Mário Luis Figueiredo e Daniele A. Lautenschlager e a equipe do laboratório BSL2: Raquel Negrão, Daniele Bruna, Camila e Priscila.

A todos os amigos do Laboratório de Virologia – USP: Eduardo Salustino, Lilian Keller, Andréa, Angélica, Ariane, César, Danila, Maria Paula, Cláudia, Gustavo, Jean, Larissa, Patrícia, Teca.

A Dr. Vivi, Dr. Silvana e Dr. Malu pelo apoio sempre que requisitada e pela amizade.

Aos amigos do Departamento de Microbiologia, Liliana, Tatiana, Solange, Cassiano, Ricardo, Juliana, Fernanda, Jô, Camila, “Frank”, Carla e Áthila, pelo apoio de sempre.

Aos técnicos do departamento Jacinta, Fabiana, Telma e José, pelo apoio sempre.

Aos Profs. de Virologia Dr. Dolores, Charlotte, Paolo e Maria Lúcia pelos ensinamentos durante todo esse período.

Aos Profs. Dr. Manoel Armando Azevedo dos Santos, Benedito Corrêa e Flávio Alterthum, a qual eu tenho orgulho de ter conhecido, além da amizade e orientações na área de microbiologia.

Aos funcionários do ICB: Alice, Aninha e Naíde pelo apoio na secretária e esclarecimentos.

Ao Instituto Biológico que através do Dr. Marcelo Eiras, despertou meu interesse pela área de virologia e aos amigos no qual não esqueço: Marina Reiter, Alexandre Chaves, Lígia, Dora, Eliana, Silvia, Maria Amélia, Fernando, Desiré, Carol e Jéssica.

Ao Prof. Dr. Sang How Han do Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica (CINTERGEN/UNIFESP) que depositou sua confiança em meu trabalho na execução do projeto Viral Genetic Diversity Network (VGDN) onde aprendi muito e conheci pessoas incríveis como a Priscila, Chester, Mariana, DaniTak, Mari e Mariana Grings.

Ao Ph. D Paul A. Rota, responsável pelo laboratório de *Measles, Mumps, Rubella and Herpes Viruses Branch, Division of Viral Diseases*, no *Centers For*

Disease Control and Prevention- CDC, por ter me recebido muito bem em seu laboratório e ter colaborado com a parte científica deste trabalho.

Ao Ph. D Michael K. Lo do *Measles, Mumps, Rubella and Herpes Viruses Laboratory Branch* no *Centers For Disease Control and Prevention- CDC*, pela ajuda na parte laboratorial e pela amizade durante minha breve estadia em Atlanta.

Ao Dr. Christopher C. Broder, do *Microbiology and Immunology of Emerging Infectious Diseases program* da *Uniformed Services University- USU* em Washington, pela oportunidade em seu laboratório de pesquisa no programa de vírus emergentes.

A Dawn Weir no *USUHS Emerging Infectious Diseases Graduate Program* *Uniformed Services University of the Health Sciences Bethesda*, pela amizade e auxílio nos experimentos laboratoriais em Washington.

Ao Alexandre Pereira do Instituto Butantã pela apoio e realização dos testes sorológicos em roedores.

A pesquisadora Ana Íris da FUNED, (Fundação Ezequiel Dias) localizada em Minas Gerais pela colaboração no envio de amostras para análise molecular de pacientes com sorologia positiva para hantavirus.

Ao Instituto de Pesquisas Ecológicas- IPÊ, por ceder gentilmente a base de apoio para os locais de coleta em Teodoro Sampaio e Nazaré Paulista.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, que me concedeu esta oportunidade na área de virologia, no qual tive boas experiências, e mudanças de atitudes. Aprendi com ele em como ser paciente ao resolver problemas, além de ter conquistado um grande amigo.

A FAPESP pelo apoio financeiro concedido, durante todo o período de pesquisa científica, incluindo a bolsa de doutorado.

E por fim, agradeço a minha futura e amada esposa Tatiana Lopes Ometto de Araujo pelo apoio, incentivo, carinho, amor e principalmente pela paciência. Minha companheira que nos momentos mais difíceis sempre esteve do meu lado durante todo este trajeto.

**A pesquisa é como a cachaça,
quando você percebe o mistério
e a pureza que existe dentro dela,
não consegue parar mais.**

RESUMO

Araujo J. Detecção molecular de Hantavírus pela técnica de Real-time PCR em amostras de roedores silvestres coletadas na região do Vale do Ribeira no estado de São Paulo [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

O conhecimento sobre hantavirus patogênicos no Brasil até o momento indica que roedores silvestres são os reservatórios naturais. Estes roedores podem eliminar grandes quantidades do vírus através das fezes, urina e saliva (Khaiboullina et al., 2005). A infecção humana pode ocorrer por contato com roedores ou inalação dos aerossóis que contêm o vírus. A síndrome cardiopulmonar por hantavirus (HCPS) tem sido relatada em humanos em muitas regiões do Brasil. Tendo em vista a quantidade de casos de doenças emergentes e re-emergentes nas últimas décadas elegemos algumas regiões para um estudo detalhado sobre a distribuição desses reservatórios virais e consequentemente a caracterização da variante circulante. Com objetivo de adquirir um diagnóstico rápido e sensível, desenvolvemos *primers* específicos que pela *técnica de Real-time RT-PCR* é capaz de detectar o genoma viral em apenas uma hora em amostras de pulmões, rins e urina de roedores. Ao todo, nosso trabalho analisou 153 amostras sendo: 126 de roedores silvestres e domésticos, (de cinco diferentes regiões do Estado de São Paulo onde: 10 amostras colhidas no município de Jacupiranga, 61 oriundas de Teodoro Sampaio, 7 de Salesópolis, 48 provenientes de Biritiba Mirim, 16 de Nazaré Paulista) e mais 27 soros de pacientes de diferentes localidades de Minas Gerais. Neste estudo foi possível detectar dez amostras positivas em Biritiba Mirim, quatro em Nazaré Paulista e em vinte e dois soros de pacientes com hantavirose. O monitoramento contínuo através de testes moleculares em animais silvestres é imprescindível para um melhor entendimento da circulação dos hantavirus nessas regiões. Acreditamos que este teste possa auxiliar na vigilância e também no diagnóstico dos hantavirus no Brasil.

Palavras-chave: Hantavirus. roedores silvestres. *Real-time PCR*. *Sybr Green*.

ABSTRACT

Araujo J. Molecular detection of hantavirus by Real- time PCR in wild rodents collected on Vale do Ribeira region, São Paulo State. [Ph. D. thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Current knowledge of the pathogenic hantavirus indicates that wild rodents are its primary natural reservoir. These rodents can eliminate large amounts of the virus through feces, urine and saliva. Human infection can occur through contact with rodents or inhalation of aerosols containing of the virus. Hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS) has been reported in humans in many regions of Brazil. In view the number of cases of emerging diseases and re- emerging in recent decades, some regions to were select a detailed study on the distribution of these viral reservoirs, and consequently viral characterization. We developed specific primers to detect the presence of viral genomes using Real- time RT- PCR (Reverse- Transcriptase Polymerase Chain Raction). Altogether, our study analyzed 153 samples: 126 of wild rodents and domestic, of five different regions of São Paulo. 10 samples collected in Jacupiranga municipality, 61 in Teodoro Sampaio, 7 Salesópolis, 48 samples in Biritiba Mirim, 16 of Nazaré Paulista and 27 samples of the serum from patients from different sites of Minas Gerais State. Their samples were tested for hantavirus using the described SYBR Green-based real-time RT-PCR protocol and the specific primers. The presence of hantavirus RNA was detected in 10 rodents from Biritiba Mirim, 4 in Nazaré Paulista and 22 in serum of patients with hantaviruse. The surveillance by molecular tests in wild animals is essential to understood of hantavirus circulation in these regions. This SYBR Green real-time RT-PCR method for detection of hantavirus may be useful for surveying hantaviruses in Brazil.

Key-words: Hantavirus. wild rodents. *Real- time PCR. Sybr Green.*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos de hantavirose por unidade federada provável de infecção e ano de ocorrência. Novembro de 1993- Agosto de 2010.....	34
Tabela 2 - <i>Primers</i> específicos desenhados para amplificar a região do gene S.....	42
Tabela 3 - Roedores capturados no Parque Estadual de Jacupiranga.....	63
Tabela 4 - Roedores silvestres capturados no Parque Estadual do Morro do Diabo.....	64
Tabela 5 - Relação de roedores domésticos capturados em residências próximas ao Parque Estadual do Morro do Diabo.....	65
Tabela 6 - Roedores capturados em Biritiba Mirim e Salesópolis no ano de 2002.....	67
Tabela 7 - Detecção do vírus em roedores silvestres <i>por Real- time RT-PCR</i> em Biritiba Mirim.....	68
Tabela 8 - Relação de animais capturados e amostras positivas na região de Nazaré Paulista.....	69
Tabela 9 - Relação soros de pacientes testados para hantavirus na região de Minas Gerais.....	70
Tabela 10 - Comparação da similaridade (%) entre nucleotídeos (acima da diagonal) a aminoácidos (abaixo da diagonal) de 264-nt da região da ORF (<i>Open Read Frame</i>) do segmento S dos hantavirus de roedores provenientes de Biritiba Mirim, São Paulo com outras depositadas no <i>GenBank</i>	74

Tabela 11 - Comparação da similaridade (%) entre nucleotídeos (acima da diagonal) a divergência (abaixo da diagonal) de 324- nt da região da ORF (*Open Read Frame*) do segmento M dos hantavirus de roedores provenientes de Biritiba Mirim, São Paulo com outras depositadas no *GenBank*77

Tabela 12 - Comparação da similaridade (%) entre nucleotídeos (acima da diagonal) a divergência (abaixo da diagonal) de 141- nt do segmento S da amostra número 10 (*Oligoryzomys nigripes*) detectada em Nazaré Paulista com outras depositadas no *GenBank*80

Tabela 13 - Comparação da similaridade (%) entre nucleotídeos (acima da diagonal) a divergência (abaixo da diagonal) de 141- nt da região da ORF (*Open Read Frame*) do segmento S dos hantavirus de detectados em soro de pacientes de diferentes localidades do Estado de Minas Gerais com outras do *GenBank*84

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Micrografia eletrônica de secções ultrafinas do vírus Sin Nombre isolado, causador da Síndrome Pulmonar por Hantavírus (HPS). (Fonte: CDC, 1999).26
- Figura 2** - Alinhamento do segmento S dos cinco hantavirus brasileiros.41
- Figura 3** - Esquema genômico e localização dos primers no segmento S.42
- Figura 4** - A- Laboratório móvel (F-350 *Vírus Buster*) utilizado nas expedições demonstrando os assessorios externos. B- Travessia em terrenos de difícil acesso. C- Barraca de apoio laboratorial. D- Estrutura laboratorial e teste molecular em campo.44
- Figura 5** - Localização dos locais de coleta das amostras para o estudo de hantavirus. Fonte: Plano Cartográfico do Estado de São Paulo45
- Figura 6** - Foto panorâmica dos locais de coleta. A- Parque Estadual de Jacupiranga. B- Parque Nacional do Morro do Diabo. C- Nazaré Paulista. D- Vista da represa de Biritiba Mirim.45
- Figura 7** - Armadilhas utilizadas na captura dos roedores: (A) Sherman (B) Tomahawk46
- Figura 8** - Treinamento realizado pelo Ministério da Saúde em Santa Tereza- ES para procedimentos de captura e coleta. A- EPIs utilizado no trabalho de campo; B- Desinfecção do material cirurgico utilizado na coleta com Lysol a 10%; C- Coleta de órgãos dos roedores; D- Desinfecção dos EPIs após o término do trabalho borrifando Lysol na concentração 10%47

Figura 9 - Cabine de biocontenção- (Glove box) usada no trabalho de campo, com filtros de proteção para não contaminar o pesquisador e o ambiente....	47
Figura 10 - (1) Biometria, (2) Colheita de sangue e (3) Retirada dos órgãos.....	48
Figura 11 - Desinfecção das armadilhas utilizadas na captura.....	48
Figura 12 - A- Desenho esquemático do laboratório <i>Klaus Eberhard Stewien</i> , BSL 3 ⁺ (Biosafety Level 3 (Folha se São Paulo, 2003). B- <i>Pass Thru</i> no processo de desinfecção química e luz ultravioleta utilizado na retirada de material do laboratório.....	49
Figura 13 - A- Visão Panorâmica do laboratório BLS 3 ⁺ B- Trabalho no fluxo laminar com amostras suspeitas. C- Cabine de Biocontenção (<i>Glove Box</i>) e Teste de <i>Real time PCR</i> . D- <i>Safe Box</i> , caixa de biocontenção utilizada para transporte de animais silvêtres.....	50
Figura 14 - Condições universais de termociclagem utilizada na padronização...	51
Figura 15 - Desenho esquemático da estrutura dos genes S e M dos Hantavirus. O gene S codifica a proteína do nucleocapsídeo, o M codifica uma poliproteína que, quando clivada, gera as duas glicoproteínas do envelope (Gc e Gn) As setas representam os <i>primers</i> utilizados na detecção denominados JAN-F (<i>forward</i>) e JAN-R (<i>reverse</i>) por <i>Real-time PCR</i> e para amplificação parcial dos genes utilizamos SAHN- S (<i>sense</i>) e SAHN- C (complementar) para S, G1/HANGn- C e G1/HANGn- S para M. As barras em cinza representam os tamanhos esperados para os fragmentos de 141, 264 e 324 pares de bases (pb) respectivamente	53
Figura 16 - <i>Real- time One Step RT- PCR</i> em campo. A- Equipamento <i>Smart Cycle II</i> (<i>Cepheid</i>) utilizado na padronização; B- O equipamento é acoplado ao <i>laptop</i> para análise dos dados; C- <i>Dry shipper</i> com reagentes mantidos a baixa temperatura utilizado na detecção. D- <i>Kit de extração</i> (<i>QIAamp Viral</i>)	

RNA Mini Kit- Qiagen) usado em campo, a temperatura ambiente. E- Gerador utilizado para o Smart Cycle II, centrifuga e o *laptop*, em locais onde não tem energia elétrica.....55

Figura 17 - Concentração dos primers utilizados na padronização do teste de detecção. A intensidade do *Sybr Green* indica o nível da amplificação.56

Figura 18 - Curva de dissociação observada do controle positivo. O eixo x representa a temperatura de *melting* e o eixo Y representa a quantidade de fluorescência emitida pelos fragmentos dissociados (derivada)..... 57

Figura 19 - Curva de dissociação utilizada na detecção dos hantavírus no Brasil. A concentração de *primer* ideal observada foi de 5,0 pmol. A concentração de 20 pmol resultou na formação de "*primer-dimers*". O eixo y representa a intensidade da fluorescência derivada e o eixo x representa a temperatura de *melting* (*Tm*) dos fragmentos amplificados.....57

Figura 20 - Curva de amplificação do controle positivo em duplicata realizado no equipamento de campo *Smart Cycle II* (Cepheid). O eixo y do gráfico representa a intensidade de fluorescência relativa (*delta Rn*) e o eixo x o *Ct* da reação.....58

Figura 21 - Curva de dissociação observada do controle positivo no equipamento de campo *Smart Cycle II* (Cepheid), O eixo x representa a temperatura de *melting* e o eixo Y representa a quantidade de fluorescência emitida. A temperatura de *melting* (*Tm*) observada foi de 83,2 °C.....58

Figura 22 - Análise eletroforética em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, do controle positivo amplificado por *Real-time PCR*; M representa o peso molecular 100 *pb DNA Ladder* (Invitrogen). A seta indica os tamanhos dos fragmentos presentes amplificados. 1- Controle positivo diluído 1: 1000 (0,0001 ng), 2- Controle negativo de célula sem inoculação

do vírus, 3- Controle positivo diluído 1:100 (0,01 ng) e 4- Controle positivo diluído 1:10 (0,1 ng)59

Figura 23 - Quantificação do material genético dos controles positivos utilizado na construção da Curva padrão.....60

Figura 24 - Curva de amplificação do controle positivo em duplicatas utilizado na construção da Curva padrão. O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta *Rn*) e o eixo y o *Ct* da reação. Cada curva representa a amplificação na diluição seriada na base 10.....60

Figura 25 - Correlação da Curva Padrão. A quantidade de RNA inicial em cada reação foi de 3,0 ng, 0,3 ng, 0,03 ng, 0,003 ng, 0,0003 ng, 0,00003 ng, 0,000003 ng e seu log está representado no eixo x. O valor do *Ct* (*threshold cycle*) obtido para cada reação está indicado no eixo y. As diluições foram feitas em duplicatas. R2 é o coeficiente de correlação .
.....61

Figura 26 - Teste de especificidade utilizando RNA viral de outros patógenos. O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta *Rn*) e o eixo y o *Ct* da reação.....62

Figura 27 - Curva de Dissociação no teste de especificidade utilizando RNA viral de outros patógenos. O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta *Rn*) e o eixo y o *Ct* da reação
.....62

Figura 28 - Detecção molecular de hantavirus em amostras de roedores silvestres capturados em Biritiba Mirim, Estado de São Paulo, Brasil66

Figura 29 - As regiões circuladas no mapa representam os locais onde foi detectada a presença do vírus, através do teste de *Real- time PCR*, em soro de

pacientes com suspeita de hantavirose no Estado de Minas Gerais.....
.....70

Figura 30 - Análise eletroforética em gel de agarose 1,5%, dos produtos amplificados do segmento S de amostras de Biritiba Mirim após a purificação. M- 100 pb DNA *Ladder* (Fermentas). A seta indica os fragmentos amplificados de 264 pb. Como controle negativo foi utilizado cultura celular sem inoculação do vírus (C-). C+/Célula- utilizamos cultura celular inoculada com o HTN007. Ambos os controles foram aplicados em gel separado. A montagem da foto foi realizada para apresentação do resultado obtido.....71

Figura 31 - Análise eletroforética em gel de agarose 1,5%, apresentando os fragmentos amplificados do gene M purificados de amostras de Biritiba Mirim. M representa o peso molecular de 100 pb DNA *Ladder* (Fermentas). A seta indica os fragmentos amplificados de 324 pb. Como controle negativo foi utilizado cultura celular sem inoculação do vírus (C-). Como controle positivo, utilizamos cultura celular inoculada com HTN007, congeladas em trizol.....72

Figura 32 - Comparação da sequência de nucleotídeos parcial do segmento S dos hantavirus encontrados em Biritiba Mirim (São Paulo, Brasil) com outras sequencias depositadas no *GenBank*. HTN007 foi o controle positivo de célula utilizado durante todo o estudo. O alinhamento foi realizado pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 6.0.7.....73

Figura 33 - Dendrograma da sequencia parcial do segmento S (264-nt) dos hantavirus examinados neste estudo (Biritiba Mirim) e outros isolados relacionados. A árvore filogenética foi construída com auxilio do programa PAUP 4.0b10, algoritmo *Neighbor- Joining* com parâmetro HKY indicado pelo *modelTest*. O *Bootstrap* >50 % foi obtido em análise de 1000 réplicas, e estão apresentadas nos pontos de ramificação. As sequências estudadas neste trabalho (número de acesso) foram: *O. nigripes* 23 ([FJ402967](#)), *O. nigripes* 36 ([FJ402971](#)), *O. nigripes* 62 ([FJ402974](#)), *A.*

montensis 63 (FJ402975), *O. nigripes* 64 (FJ402976), *Thaptomys nigrita* (FJ402977), *Juliomys* sp. (FJ402978), *Oryzomys* sp. (FJ402979), *A. montensis* 71 (FJ402981), *A. montensis* 73 (FJ402982). As sequencias incluídas na análise foram (numero de acesso no GenBank): Anajatuba (DQ451829), Rio Mamoré (U52136), HTN-007 (AF133254), ARAV (EF571895), JUQV (EF492472), CASV (AF307324). Em azul está representado a amostra associada ao JUQV e em vermelho as amostras associadas ao ARAV.....75

Figura 34 - Dendrograma da sequencia parcial do segmento M (324- nt) dos hantavirus examinados neste estudo (Biritiba Mirim) e outros isolados relacionados de diferentes localidades. A árvore filogenética foi construída com auxilio do programa PAUP 4.0b10, algoritmo *Neighbor- Joining* com parâmetro Tamuranei indicado pelo programa *modelTest*. As sequencias incluídas na análise são: Anajatuba (DQ451829), Rio Mamoré (U52136), HTN-007 (AF133254), ARAV (EF571895), JUQV (EF492472), CASV (AF307324), Laguna Negra (AF0057281) Hantaan (U381771), Prospect Hill (X55129.1), Puumala (AB297666.2), Cano Delgadito (DQ2844511), New York (U368031), Convict Creek (L334741), Sin Nombre (L257831), Andes (AF3249012), Bayou (L36930.1), Lechiguanas (AF0280221). Em azul está representado a amostra associada ao JUQV e em vermelho as amostras associadas ao ARAV.....76

Figura 35 - Curva de amplificação (*Ampliplo_t*) das amostras analisadas provenientes de urina de roedores capturados em Nazaré Paulista. O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta *Rn*) e o eixo y o *Ct* da reação. As amostras clínicas são observadas nos ciclos (*Ct* entre 34 a 39).....78

Figura 36 - Análise eletroforética em gel de agarose 2,0 %, dos produtos amplificados por *Real- time PCR* de amostras de Nazaré Paulista. M- 100 pb DNA *Ladder* (Fermentas). A seta indica os fragmentos amplificados de

141 pb. Os números de 2 a 12 representam as amostras de urina dos roedores testados. 1- Controle negativo.....79

Figura 37 - Análise da Curva de Dissociação das amostras de Nazaré Paulista. O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta *Rn*) e o eixo y o *Ct* da reação.....79

Figura 38 - Dendrograma construído a partir da sequência parcial do segmento S (141- nt) obtida de *Oligoryzomys nigripes* capturado em Nazaré Paulista com outros isolados relacionados.....81

Figura 39 - Alinhamento da sequência de nucleotídeos parcial do segmento S de 141 pb detectadas em de soros de pacientes do Estado de Minas Gerais com outras sequências depositadas no *GenBank*. O alinhamento foi realizado pelo programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 6.0.782

Figura 40 - Dendrograma construído a partir da sequência parcial do segmento S (141- nt) dos hantavirus examinados neste estudo (soros de pacientes do Estado de Minas Gerais) e outros isolados relacionados. A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa PAUP 4.0b10, algoritmo *Neighbor- Joining* com parâmetro HKY indicado pelo *modelTest*. O *Bootstrap* >50 % foi obtido em análise de 1000 réplicas, e estão apresentadas nos pontos de ramificação. As sequencias incluídas na análise foram (numero de acesso no *GenBank*): Anajatuba (DQ451829), Laguna Negra (AF005727), HTN-007 (AF133254), ARAV (EF571895), JUQV (EF492472), CASV (AF307324). Em azul estão representadas as amostras associadas ao JUQV e em vermelho as amostras associadas ao ARAV.....83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Histórico	24
1.2 Classificação	25
1.3 Morfologia	25
1.4 Organização Genômica e Proteínas virais	26
1.4.1 <i>Gene Small</i>	27
1.4.2 <i>Gene Medium</i>	28
1.4.3 <i>Gene Large</i>	28
1.5 Agente Etiológico	28
1.6 Sintomatologia	29
1.7 Epidemiologia	30
1.8 Hantavírus no Brasil	31
1.9 Diagnóstico laboratorial	35
1.10 Prevenção e controle	38
1.11 Avanços e Inovações	39
2 OBJETIVOS	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Obtenções das Sequencias	41
3.2 Alinhamento das Sequências	41
3.3 Controles positivos	42
3.4 Vírus e Cultura Celular	42
3.5 Captura dos animais	43
3.6 Extração do material genético	48
3.7 Transcrição Reversa- RT	50

3.8 Real Time- PCR (Sistema SYBR Green)	50
3.9 Curva de Dissociação	51
3.10 Construção da Curva padrão	52
3.11 RT- PCR convencional	52
3.12 Purificação do produto de PCR	52
3.13 Sequenciamento de DNA	53
3.14 Alinhamento e Análise Filogenética	54
3.15 Inovações	54
4 RESULTADOS	56
4.1 Padronização do Real- time PCR (Sistema SYBR Green)	56
4.1.1 Análise da Curva de Dissociação	56
4.1.2 Confirmação em gel de Agarose	59
4.1.3 Curva padrão, sensibilidade e especificidade	59
4.2 Esforço amostral e Análise Molecular	62
4.2.1 Parque Estadual de Jacupiranga	63
4.2.2 Parque Estadual do Morro do Diabo	63
4.2.3 Região de Mata Atlântica em Biritiba Mirim e Salesópolis	66
4.2.4 Região de Mata Atlântica em Nazaré Paulista	69
4.2.5 Real-time RT-PCR em soros humanos	69
4.3 Amostras positivas provenientes de Biritiba Mirim	71
4.3.1 RT- PCR convencional	71
4.3.2 Análise de sequencias e Filogenia	72
4.4 Análise das amostras positivas provenientes de Nazaré Paulista	78
4.4.1 Real-time RT- PCR	78
4.4.2 Análise em gel de agarose	79

4.4.3 Análise da Curva de Dissociação	79
4.4.4 Sequenciamento	80
4.5 Análise das amostras de soro humano	81
5 DISCUSSÃO	85
5.1 Padronização da técnica de Rea- time RT- PCR	85
5.2 Parque Estadual de Jacupiranga	88
5.3 Parque Estadual do Morro do Diabo	88
5.4 Biritiba Mirim e Salesópolis	89
5.5 Nazaré Paulista	91
5.6 Detecção em soro humano	93
5.7 Inovações	94
5.8 Considerações finais	95
6 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Atualmente doenças são classificadas como emergentes caracterizadas pelo fato de nunca terem sido descritas ou re-emergentes quando reaparecem após um longo período de latência biológica. Isso pode ocorrer pelo fato de que pelos mais diferentes motivos o equilíbrio natural é alterado, por desmatamento ambiental ou invasão de novos ambientes, sem qualquer tipo de controle (Morse, 1997; Schatzmayr, 2001). No Brasil essas doenças são transmitidas por artrópodes, insetos e roedores em geral (Vasconcelos et al., 2001). Um exemplo de doença emergente no Brasil são as hantavirose.

Hantavirose constitui infecções zoonóticas amplamente distribuídas em todo o mundo. O conhecimento desta zoonose indica que roedores silvestres são os reservatórios naturais do vírus. Estes agentes pertencem à família *Bunyaviridae*, gênero *Hantavírus*. Os animais infectados podem eliminar grandes quantidades do vírus através das fezes, urina e saliva durante toda sua vida. Mais de 50 hantavirose tem sido relatada pelo mundo (Easterbrook e Klein, 2008). A infecção humana pode ocorrer por contato direto com roedores ou inalação dos aerossóis que contenham o vírus.

Os hantavírus surgiram na década de 50, inicialmente conhecidos como Febre Hemorrágica da Coreia e foram responsáveis pela morte de soldados americanos durante a guerra na Coreia do Norte. Entretanto o agente etiológico só foi identificado em 1978, 25 anos após o fim da guerra. Dr. Lee o batizou de "*Hantaan*," devido a um pequeno rio (*Han*) perto da fronteira entre as duas Coreias em um vale (*Taan*), onde a infecção humana era endêmica (Lee et al., 1978; Lee et al., 1982; Johnson, 2004; Khaiboullina et al., 2005). Pela primeira vez foi isolado a partir de tecido pulmonar de roedores silvestres, capturados na zona rural do Sul da Coreia (Lee, 1976 e 1977). Esses dados contribuíram para o grande avanço no conhecimento das formas de transmissão e disseminação do vírus da febre hemorrágica com síndrome renal (HFRS). Em meados dos anos 90, uma nova forma de hantavirose, que ataca basicamente os pulmões, apareceu no Novo México-EUA, um hantavírus foi identificado como o seu causador. A Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (HCPS), reconhecida como entidade clínica desde

1993 nos EUA, representa uma das principais doenças emergentes e encontra-se distribuída em diversos países do continente americano, incluindo o Brasil (Chapman et al., 2002; Ferreira et al., 2003).

1.2 Classificação

A família *Bunyaviridae* é composta por cinco gêneros: *Bunyavirus* (Encefalite La Crosse), *Phlebovirus* (Febre do Rift Valley), *Nairovirus* (Febre Hemorrágica de Crimeia – Congo) *Tospovirus* (Vírus de planta, não se conhece enfermidade em humanos) e *Hantavirus*. O gênero Hantavirus é responsável pela causa de dois tipos de doenças distintas: a Febre hemorrágica com síndrome Renal (HFRS) relatada na Europa e na Ásia e a Síndrome Cardiopulmonar (HCPS) encontrada nas Américas (Schmaljohn e Hjelle, 1997; Zhao et al., 1997; Kruger et al., 2001; Schmaljohn et al., 2007; Pettersson et al., 2008).

1.3 Morfologia

Os Hantavirus são vírus esféricos envelopados com diâmetros que variam de 80 a 120 nanômetros (nm) (**Figura 1**). Possuem glicoproteínas de superfície que estão inseridas em um envelope bilipídico de aproximadamente 6 nm de espessura. Suas espículas são estruturas formadas por glicoproteínas virais (G1 e G2) atualmente conhecidas como Gn e Gc respectivamente.

Figura 1 - Micrografia eletrônica de secções ultrafinas do vírus Sin Nombre isolado, causador da Síndrome Pulmonar por Hantavírus (HPS).
(Fonte: Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), 1999).

1.4 Organização Genômica e Proteínas virais

As partículas são compostas de RNA de fita simples de polaridade negativa. Sua composição química é basicamente formada de 2% de RNA, 58% de proteínas, 33% de lipídeos e 7% de carboidratos. São formados por três segmentos de RNA designados por *Small* (S), *Medium* (M) e *Large* (L), no qual codificam o nucleocapsídeo (N), glicoproteínas do envelope (Gn e Gc), e a RNA Polimerase (Pol), respectivamente (Khaiboullina et al., 2005; Easterbrook et al., 2008). O genoma, por inteiro, possui entre 12.000 a 13.000 nucleotídeos. A replicação desses agentes se dá exclusivamente no citoplasma das células hospedeiras, a penetração ocorre por acoplamento dos vírus a receptores celulares específicos com subsequente endocitose. O nucleocapsídeo é introduzido no citoplasma por fusão do vírion com a membrana endossomal, iniciando-se posteriormente a transcrição dos genes virais para a produção das proteínas que irão constituir parte dos novos vírions. Essas partículas recém-formadas são então transportadas para vesículas

secretores da membrana citoplasmática e liberadas por exocitose. Cada vírus infecta roedores específicos, e a denominação do agente deriva da região em que foi descrito pela primeira vez. O sequenciamento de alguns vírus tem sido realizado a partir do RNA extraído de material de necropsia ou de vírus obtido em culturas de células. (Lee, 1982; Fields et al., 1996; Schmaljohn, 1996; CDC, 1999; Van Regenmortel et al., 2000).

O genoma de diversos hantavírus confirma a existência de múltiplas linhagens filogenéticas, com divergência variável entre os genes, por vezes elevada, como ocorre com o vírus *Sin Nombre*, predominante na América do Norte, por exemplo, onde pode-se observar diversidade na sequência de nucleotídeos em certos genes de até 23%; quando se compara as sequências desses vírus com outros hantavírus, inclusive com cepas da Eurásia, não se encontra explicação plausível para o comportamento diferente dos vírus do velho mundo e os das Américas (Ferreira, 2003).

A fim de aperfeiçoar inéditas descrições de um novo agente, pesquisadores concluíram que é possível através da análise genômica dos segmentos S e M obterem uma fidelidade na classificação de novos isolados. Além disso, esta análise pode ser uma ferramenta importante na identificação correta das espécies de hantavirus quando não for possível o isolamento em cultura celular (Maes et al., 2009).

1.4.1 Gene Small

O menor gene (Small) possui aproximadamente 1800 pares de base (pb) e codifica a proteína multifuncional do nucleocapsídeo (N). Atualmente, autores sugerem a possibilidade de utilizar este gene como critério de demarcação para classificação dos grupos dos Hantavirus, quando a sequência aminoácídica (aa) apresentar uma distância acima de 24% entre os isolados e até segregar as espécies quando observada uma distância maior que 10% entre os aminoácidos (Schmaljohn, 1996; Pereira, 2006; Maes et al., 2009).

1.4.2 Gene Medium

O segmento M dos hantavirus possui o tamanho aproximado de 3600 pb e codifica uma poliproteína que, quando clivada, gera duas glicoproteínas do envelope: a Gn e a Gc também anteriormente conhecidas como G1 e G2 apresentando por volta de 1700 e 1430 pb respectivamente. (Schmaljohn et al., 1987; Figueiredo et al., 2008; Zou et al., 2008). Assim como o segmento S, o gene M pode ser utilizado na segregação dos principais grupos conhecidos mundialmente quando a distância de aminoácidos for maior que 32% e no caso das espécies quando observada uma distância acima de 12% dos aminoácidos (Schmaljohn, 1996; Pereira, 2006; Maes et al., 2009).

1.4.3 Gene Large

O segmento maior (L) possui por volta de 6550 pb e codifica a RNA Polimerase. Está relacionado com funções de transcriptase/replicase viral. Ao contrário, dos outros dois genes, por se tratar de um fragmento maior e poucas sequencias disponíveis, ainda não é possível utilizá-lo seguramente na classificação viral (Schmaljohn, 1996; Pereira, 2006; Maes et al., 2009).

1.5 Agente Etiológico

O conhecimento sobre hantavirus patogênicos indica que roedores silvestres são os reservatórios naturais responsáveis pela disseminação de doenças humanas na Ásia, Europa, América do Norte e América do Sul (Mills et al., 1998). A HFRS mostra-se endêmica na Ásia e Europa, acometendo milhares de pessoas anualmente. Na América do Sul, as hantaviroses têm sido relatadas na Argentina (Andes), Chile (Andes), Uruguai (Andes), Paraguai (Laguna Negra), Bolívia (Laguna Negra e Rio Mamoré), Venezuela (Caño Delgadito) e no Brasil (Araraquara and Juquitiba) (Padula et al., 2000).

A evolução das hantaviroses americanas parece estar intimamente relacionada com a evolução dos seus reservatórios hospedeiros, os quais são

classificados na ordem *Rodentia*, família *Muridae* e subfamília *Sigmodontinae* (ratos do novo mundo) (Schmaljohn e Hjelle, 1997; Zhao e Hay, 1997). A aparente ligação entre os hantavírus e os seus roedores específicos sugere que esses agentes patogênicos compartilham um ancestral comum, o que provavelmente ocorre também com os vírus encontrados em animais das subfamílias *Murinae* e *Arvicolinae* (ratos do velho mundo) (Mills et al., 1998; Ferreira et al., 2003). Pesquisadores identificaram a circulação através de registro fóssil de roedores murídeos, há pelo menos, vinte milhões de anos na América do Norte e três milhões e meio na América do Sul (Nowak, 1991).

Através de análise filogenética, utilizando genes mitocondriais de hospedeiros de hantavirus, cada espécie parece estar envolvida com uma espécie de roedor ou hospedeiro insetívoro específico (Plyusnin, 2001).

1.6 Sintomatologia

A doença pode manifestar-se sob duas formas clínicas: Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (HFRS) e Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (HCPS). A HCPS é uma doença emergente e tem sido até o momento, a forma prevalente nas Américas. Com relação a sua gravidade, pode variar desde doença febril aguda, cuja suspeita diagnóstica é baseada, fundamentalmente, em informações epidemiológicas, até quadros pulmonares e cardiovasculares, mais características ou eventualmente, como uma febre hemorrágica com comprometimento renal (Peters et al., 1999; Borges et al., 2006; Song et al., 2009). A infecção inicia-se usualmente após a inalação de excretas de roedores contaminados com o vírus.

A HCPS é caracterizada pelo início de febre, mialgia e dores abdominais acompanhada rapidamente de tosse e dispnéia, que são seguidos habitualmente pela insuficiência respiratória aguda, pelo colapso circulatório e na maioria dos casos a morte (Figueiredo et al., 1999, Silva- Vergara 2002; Borges et al., 2006). O período de incubação humana dos vírus varia de cinco a quarenta e cinco dias, sendo em média, de doze a vinte dias (Iversson, 1996; *Centers Diseases Control and Prevention*, 1999). Não há tratamento específico. Recomenda-se hidratação cuidadosa, indicação precoce de diálise nas formas renais e administração de drogas vaso ativa nos períodos de hipotensão e choque. A administração de corticosteróides e da ribavirina está sendo avaliada em estudos controlados. O

número de casos dessas viroses tem crescido no Brasil ano a ano, e cumpre alertar os profissionais de saúde sobre a ocorrência dessas entidades nos vários estados do país, possibilitando diagnóstico precoce e tratamento adequado nos casos suspeitos da doença (Figueiredo et al., 2001; Borges et al., 2006; Figueiredo et al., 2008).

A grande dificuldade no diagnóstico desta zoonose é que a hantavirose por provocar febre, dores nas costas, náuseas e vômitos, é facilmente confundida com gripe, dengue ou leptospirose (Borges et al., 2006). Os surtos da doença estão relacionados, sobretudo à expansão das cidades sobre o habitat dos roedores, ao desmatamento e, no campo, está geralmente associada a plantações de soja, milho e feijão, bem como de pastos com braquiárias (local preferido por esses pequenos roedores, onde se abrigam e alimentam-se) próximos a residências (Pereira, 1999; Fundação Nacional de Saúde, 2002).

1.7 Epidemiologia

Os hantavírus surgiram na década de 50, responsáveis pela morte de soldados americanos durante a guerra na Coreia do Norte às margens do rio *Han Tan*, originando o nome do vírus (Lee et al., 1978).

Em Maio de 1993, surge uma nova doença acometendo vários indivíduos saudáveis de forma repentina e progressiva. A doença foi inicialmente confundida com um tipo de Influenza- like seguido por uma doença rapidamente progressiva pulmonar edema, insuficiência respiratória e choque (Nichol et al., 1993; Zaki et al., 1995). Diversos testes foram executados para detecção de agentes bacterianos e virais além de testes toxicológicos, mas todos apresentaram resultados negativos. Neste período, amostras de doentes foram enviadas ao Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Testes imuno-histoquímico detectaram a presença de anticorpos em reação cruzada com antígenos hantaviral no soro dos pacientes sugerindo os hantavírus como causador da nova doença (Ksiazek et al., 1995). Esta observação foi posteriormente confirmada pelo sequenciamento do nucleocapsídeo analisados de tecidos da autópsia. O agente causal foi isolado de ratos silvestres, *Peromyscus maniculatus*, considerado o reservatório natural e vetor deste vírus zoonótico recebendo posteriormente o nome de Sin Nombre vírus (SNV) (Nichols et

al., 1993; Chizhikov et al., 1995). Embora a síndrome tenha sido reconhecida pela primeira vez em 1993, estudos retrospectivos documentam a existência precoce da doença. O caso mais antigo identificado ocorreu em 1978, 15 anos antes do surto no sudoeste dos Estados Unidos. Testes de imuno-histoquímica mostraram amplo depósito de antígenos hantaviral, principalmente dentro das células endoteliais, similar ao padrão observado com hantavírus atual de síndrome pulmonar (Zaki et al., 1996).

A partir dos casos ocorridos nos EUA, médicos ficaram alerta para identificação de novos casos dessa doença.

Além de infecções zoonóticas, existem evidências que sugerem a transmissão de pessoa-pessoa do vírus Andes na Argentina (Wells et al., 1997; Martinez et al., 2005; Lazaro et al., 2007) e no Chile (Toro et al., 1998; Ferrez et al., 2007). Estudos moleculares recentes conseguiram identificar a presença do vírus em saliva de pacientes infectados com o vírus Puumala na Suécia. Os dados mostram que o RNA pode ser detectado na saliva humana durante vários dias após o início dos sintomas (Pettersson et al., 2008).

1.8 Hantavírus no Brasil

O primeiro caso confirmado de hantavírus na América do Sul ocorreu na região do Vale do Ribeira em Juquitiba, Estado de São Paulo, Brasil levando o nome do município em que foi encontrado (Iversson et al., 1994; Vasconcelos et al., 1997; Silva et al., 1997). Em 1996, uma nova linhagem de hantavirus foi encontrada em humanos diagnosticados no município de Araraquara (ARA) (Johnson et al., 1999).

No Brasil cada tipo de hantavírus parece estar associado a uma espécie de roedor silvestre. Atualmente existem cinco tipos de hantavirose associadas à HCPS conhecidas: Juquitiba (JUQ), Araraquara (ARA), Castelo dos Sonhos (CAS) Laguna Negra-like (LNV) e Anajatuba virus (ANAJV) (Johnson et al., 1999; Figueiredo et al., 2008; Oliveira et al., 2009).

Suzuki et al. (2004) verificaram através da técnica de *Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction (RT PCR)* e do sequenciamento de DNA que o vírus de Araraquara está associado ao *Bolomys lasiurus* (atual *Necromys lasiurus*-rato-de-rabo-peludo), que vive principalmente no Cerrado, no oeste paulista e em três outros

estados (Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás) (Suzuki et al., 2004). Outro hospedeiro trata-se do ratinho-do-arroz (*Oligoryzomys nigripes*), encontrado em regiões de Mata Atlântica, servindo de reservatório carregando o hantavírus Juquitiba, foi identificado em 1994 nos arredores da cidade de São Paulo e despontando posteriormente no Paraná (Vasconcelos et al., 1997). Testes sorológicos em roedores da espécie *Akodon sp.* sugerem um possível reservatório de hantavírus (Katz et al., 2001).

No Estado de São Paulo, a maioria dos casos de SCPH ocorre entre Fevereiro e Maio, período que corresponde ao início da estação seca, ao início da safra da cana-de-açúcar, com queimadas em canaviais e, também, à época do aparecimento de sementes no capim braquiária, muito apreciadas como alimento pelos roedores silvestres (Iversson et al., 1994; Pereira et al., 1999; Figueiredo et al., 2000; Romano et al., 2001; Secretaria de Vigilância em Saúde 2010).

Após o primeiro relato, a cada ano, novos relatos são identificados. Dois casos fatais de síndrome pulmonar ocorreram em maio de 1998, na Cidade de Guariba, localizada na região nordeste de São Paulo, envolvendo pessoas trabalhando na estocagem de milho em paiol infestado de roedores (Figueiredo et al., 1999). Em 2001, Mendes e colaboradores descreveram também mais dois casos que adquiriram a doença, e foram a óbito em Anajatuba no Maranhão. A hantavirose foi adquirida possivelmente no trabalho rural nesta região juntamente com hábito destas famílias estocarem arroz dentro de casa, proporcionando a aproximação de roedores para dentro do recinto (Mendes et al., 2001).

Só no ano de 2004, foram reportados 163 casos devido ao surto ocorrido na região sul do país e nas cidades satélites do Distrito Federal (FUNASA, 2005). Nos anos seguintes, houve aumento com 167 em 2005 e recorde de 191 novos casos em 2006, com maior número relatado na região sudeste do país (SVS, 2010).

No Rio de Janeiro pesquisadores relataram pela primeira vez a detecção de um Juquitiba-like hantavirus no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, em roedores selvagens (*Oligoryzomys nigripes*). Entretanto, não há relatos de casos humanos no estado até o momento (Oliveira et al., 2009).

Quanto ao vírus Laguna Negra, primeiramente descrito na Bolívia (Johnson et al., 1997), recentemente foi constatado um caso fatal no Mato Grosso. A região apresenta características ambientais modificadas, onde o cerrado foi substituído pela produção agrícola e pastagens em grande parte do estado, além disso, faz

fronteira com a Bolívia onde a circulação de hantavírus é bem documentada. Associado ao aumento da população no local, um crescente número de casos de HCPS foi relatado pelo Ministério da Saúde. Testes moleculares, histopatológicos e sorológicos, sugerem o primeiro caso descrito deste vírus no Brasil (Raboni et al., 2009).

De novembro de 1993 até Agosto de 2010 foram relatados 1253 novos casos em diversas regiões do país (**Tabela 1**). Foram confirmados 79 casos na região Norte sendo: 72 (91,13%) no estado do Pará, 3 (3,79%) em Rondônia e 4 (5,08%) no Amazonas. No nordeste 14 casos distribuídos: 11 (78,57%) no Maranhão, 2 (14,29%) no Rio Grande do Norte e apenas 1 (7,14%) na Bahia. Na região sudeste foi detectado um alto índice de 372 casos, sendo: 236 (63,44%) em Minas Gerais (Estado com maior número de casos até o momento) e 136 (36,56%) em São Paulo. No Sul em destaque com maior número de casos por região apresenta 473 registros: 184 (38,90%) no Paraná, 211 (44,60%) em Santa Catarina e 78 (16,50%) no Rio Grande do Sul. Por fim, 295 casos no Centro Oeste, sendo: 177 (60,00%) no estado do Mato Grosso, 51 (17,28%) em Goiás e 67 (22,72%) no Distrito Federal (SVS 2010). As regiões Sul e Sudeste apresentam o maior número de casos, geralmente em indivíduos que trabalham com cereais (nos locais de armazenagem, é comum encontrar roedores) (Silva- Vergara et al., 2002; Ferreira et al., 2003; SVS 2010). Até Junho de 2010, 54 novos casos foram relatados com 44,4% de letalidade até o momento com maior número registrado no estado de São Paulo e Distrito Federal (SVS 2010). No Brasil a taxa de letalidade é aproximadamente 50% (Mendes *et. al.*, 2001; Khaiboullina et al., 2005). Em 70% dos casos registrados, pacientes acometidos desenvolvem atividades ligadas a agricultura ou exploração florestal (Elkhoury et al., 2005).

Tabela 1 - Casos de hantavirose por unidade federada provável de infecção e ano de ocorrência. Novembro de 1993- Agosto de 2010*.

U F	COD	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
Rondônia	11												1		-	1	1			3
Acre	12																			-
Amazonas	13												3	1						4
Roraima	14																			-
Pará	15			1					1	1		2	2	9	15	9	17	15	2	72
Amapá	16																			-
Tocantins	17									-										-
NORTE		-	-	1	-	-	-	-	1	1		2	6	10	15	10	18	15	2	79
Maranhão	21								1	2		4			2		1	1	-	11
Piauí	22												-							-
Ceará	23																			-
R.G.do Norte	24							1		1										2
Paraíba	25																			-
Pernambuco	26																			-
Alagoas	27																			-
Sergipe	28																			-
Bahia	29				1															1
NORDESTE		-	-	-	1	-	-	1	1	3		4	-	-	2	-	1	1	-	14
Minas Gerais	31	-	-	-	-	-	2	3	9	5	14	21	39	39	34	27	19	24	-	236
Espírito Santo	32																			-
Rio de Janeiro	33																			-
São Paulo	35	3	-	-	2	-	5	10	1	8	15	17	10	11	9	19	16	10	15	136
SUDESTE		3	-	-	2	-	7	13	10	13	29	38	49	50	43	46	35	34	15	372
Paraná	41							7	24	30	15	14	10	48	10	6	10	10	1	184
Santa Catarina	42							1	5	16	11	16	41	23	50	19	17	12	7	211
R.G. do Sul	43						4	4	10	6	7	2	8	3	11	4	9	10	1	78
SUL		-	-	-	-	-	4	12	39	52	33	32	59	74	71	29	36	32	9	473
Mato Grosso	51							3	2	10	11	5	9	12	49	29	21	26	12	177
M.G.do Sul	50														-					-
Goiás	52	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	9	5	5	6	10	13	4	51
D. Federal	53												27	16	5	7	3	9	12	67
CENTRO OESTE		-	-	-	-	-	-	3	3	10	11	7	45	33	59	42	34	48	28	295
Indet. / Ignorada									1			1	4		1	7	2	4	-	20
TOTAL		3	-	1	3	-	11	29	55	79	73	84	163	167	191	134	126	134	54	1.253

(*) Dados sujeito a revisão

Fonte: (Grupo de Doenças Relacionadas a Roedores. Secretária de Vigilância em Saúde/MS, 2010)

Não só o desmatamento descontrolado, mais outros pequenos fatores contribuem para a transmissão de novos vírus. O constante crescimento nos últimos anos no mercado do ecoturismo tem ganhado espaço por proporcionar aventuras a lugares que antes não eram acessíveis, desbravando regiões ainda desconhecidas. Esse tipo de atividade quando praticada em lugares onde possam estar abrigando reservatórios virais, poderá trazer sérios riscos à saúde pública.

1.9 Diagnóstico laboratorial

Geralmente o diagnóstico das hantaviroses é feito através de testes sorológicos imunoenzimáticos (ELISA) onde são identificados anticorpos específicos das classes IgM e IgG (Figueiredo et al., 2008; De Souza et al., 2008; Cueto et al., 2008; Limongi et al., 2009). Para tanto, tem-se utilizado uma proteína recombinante (N) do Hantavírus Sin Nombre, fornecidos pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC - USA) ou por testes de imuno- histoquímica (Castro-Arellano et al., 2009).

Na Argentina pesquisadores desenvolveram um método de detecção utilizando a proteína N recombinante do vírus Andes na América do Sul (Padula et al., 2000; Moreli et al., 2004; Oliveira et al., 2004).

Atualmente, novos testes tem sido propostos para o diagnóstico de hantavirose no Brasil. Utilizando uma proteína N recombinante semelhante ao vírus Araraquara pesquisadores sugerem que esta pode ser usada como antígeno nos testes de screening sorológicos para detecção de infecções por hantavirus (Figueiredo et al., 2008).

O isolamento dos hantavirus a partir de materiais clínicos é muito difícil, no entanto, pode ser feito através de inoculação em células Vero (clone E6), oriundas de rim de macaco verde africano, consideradas as mais suscetíveis de se trabalhar. Os vírus replicam lentamente, alcançando a produção máxima da progênie entre 5 a 14 dias. A replicação deste vírus produz pouco, ou quase nenhum efeito citopático (Lee et al., 1978; Peters, 1999). Por este motivo, ainda não foram isolados no Brasil Hantavírus que causam a HSPC, havendo apenas detecção de fragmentos de genomas virais por RT-PCR até o momento. Entretanto, o manuseio das amostras clínicas e o isolamento viral devem ser feitos em laboratórios especiais de biosegurança nível três (**BioSafety Level 3**), adequados ao trabalho com agentes

altamente patogênicos, potencialmente letais, e construídos com equipamentos para descontaminação e filtros de alta eficiência (HEPA) para renovação do ar. O pesquisador recebe treinamento especial e aparaamenta-se devidamente utilizando máscaras com filtro de ar (*Air Mate*- pressão positiva) para proteção respiratória (CDC Guidelines, 1994).

Hoje felizmente o Brasil pode contar com esta tecnologia. Em novembro de 2003 foi inaugurado no Instituto de Ciências Biomédicas de São Paulo/USP o primeiro laboratório BSL 3⁺ (*Dr. Klaus Eberhard Stewien*) adequado para trabalhar em segurança com as principais viroses emergentes. Em 2008, foram inaugurados novos laboratórios BSL 3, construídos para o trabalho com vírus letais, como por exemplo no Centro de Pesquisa em Virologia/USP- Ribeirão Preto.

Tendo em vista a dificuldade de se trabalhar com vírus emergentes e letais, novas técnicas estão sendo empregadas na detecção e caracterização dos hantavírus. Os ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR) constituem métodos rápidos de caracterização genética de novos vírus, além de ser um método de diagnóstico virológico que se mostra menos laborioso que o isolamento viral, não exigindo condições BSL 3 de biosegurança para sua execução. Métodos moleculares são muito sensíveis, o que permite a identificação espécie- específica do vírus, além de serem utilizados na detecção viral de uma infecção antes que os sintomas se tornem mais graves. O RNA viral do vírus Andes foi detectado por RT-PCR no soro de um paciente assintomático que veio a óbito mais tarde, porém nenhum anticorpo foi detectado no soro antes de sua morte (Galeno et al., 2002).

A RT- PCR pode ser efetuada após extração de RNA, diretamente do sangue total ou soro de pacientes com suspeita de HSPC (Raboni et al., 2009; Figueiredo et al., 2009), saliva (Pettersson et al., 2008) ou materiais de roedores (Zou et al., 2008; Delfaro et al., 2008) detectando a presença do genoma viral. A análise filogenética dos hantavírus da Eurásia e das Américas indica que a relação entre eles corresponde à filogenia dos seus hospedeiros (Medina et al., 2009; Figueiredo et al., 2009). Quando ocorreu a epidemia pelo vírus *Sin Nombre* nos anos posteriores, graças às técnicas de biologia molecular, pôde-se isolar diversos outros membros desse grupo, não só nos Estados Unidos, mas também em diversos países latino-americanos. Esta análise permite um melhor conhecimento do vírus, inclusive permitindo, por analogia, inferências quanto a seus roedores- reservatórios

(Henttonen et al., 2008). Materiais de necropsia de casos fatais de SPCH, como pulmões e outros órgãos, também podem ser detectada a presença viral por RT-PCR, após extração de RNA tecidual. Os Hantavírus podem ser detectados em diversos órgãos, sangue, saliva, fezes e urina de roedores mesmo meses após a infecção (McKee et al., 1985; Green et al., 1998; Ferreira 2003; Moreli et al., 2004; Pettersson et al., 2008).

Com o passar dos anos evidentemente, avanços tecnológicos aumentaram a rapidez e sensibilidade no diagnóstico viral.

Higuchi et al. durante os anos de 1992 e 1993, através da construção de um sistema que detecta os produtos de PCR conforme são acumulados foram os pioneiros nas análises cinéticas utilizando PCR. Atualmente, a *Real-time* PCR, como é conhecida, passou por modificações cruciais durante esses últimos anos e hoje se mostra como o melhor e mais confiável método de quantificação gênica baseada em PCR em tempo real (Higuchi et al., 1992; Higuchi et al., 1993; Ylitalo et al., 2000; Cubie et al., 2001; Pettersson et al., 2008).

SYBR Green é uma pequena molécula (*minor-groove*) ligada a um corante que possui alta afinidade por dupla fita de DNA (dsDNA), e exibe maior fluorescência quando ligado a dsDNA (Wittwer et al., 1997). A molécula de *SYBR* é excitada a um comprimento de onda de 485 nm e sua emissão é medida em 520 nm (Dhar et al., 2001; Lukhtanov et al., 2007).

A visualização do DNA alvo é realizada através do monitoramento da fluorescência liberada no final de cada ciclo, permitindo a detecção do produto durante o intervalo linear de amplificação. O resultado final é um aumento da intensidade de fluorescência, proporcional à quantidade do produto da PCR acumulado. A curva de amplificação depende evidentemente da concentração inicial do seu DNA alvo.

A especificidade do produto amplificado é determinada quando analisada sua curva de dissociação. Uma vez que, a curva de dissociação está diretamente relacionada ao comprimento, composição e quantidade de GC da sequência (Pryor e Wittwer, 2006). Seu fragmento amplificado específico pode ser facilmente distinguido de outros fragmentos não desejados (inespecíficos) (Ririe et al., 1997). Outra vantagem deste método é que não é necessário realizar gel de eletroforese ou manipular seu produto pós-amplificado para a análise, o que reduz o tempo e diminui significativamente problemas de contaminação.

A quantificação da carga viral das amostras pode ser obtida através do uso de uma curva padrão que determina o número de cópias inicial e da medida do C_T (*threshold cycle* ou ciclo limite). Realizando diluições seriadas a partir de uma concentração conhecida de um controle padrão (número de cópias do plasmídeo, nanogramas/ μ L ou PFU/ μ L- unidade formadora de placa) é possível obter a quantificação comparando com a amostra clínica (Lyamichev et al., 1993).

Em 2005, Aitichou et al. desenvolveram sondas capazes de detectar e identificar quatro tipos de hantavíroses (Dobrava [DOB], Hantaan [HTN], Puumala [PUU], e Seoul [SEO]) com alto grau de especificidade usando *TaqMan® Probe systems* (Aitichou et al., 2005). Usando *SYBR Green real-time RT-PCR*, pesquisadores detectaram e caracterizaram geneticamente um Dobrava vírus (DOBV) em roedores capturados na Hungria (Jakab et al., 2007).

No Brasil ainda não se tem trabalhos utilizando a técnica de *Real-time PCR* baseado em *SYBR Green* para detecção de hantavírus.

1.10 Prevenção e controle

Normalmente a transmissão da SCPH ao homem está associada a fatores e fenômenos ambientais, que forçam deslocamentos de populações de roedores. As inundações, queimadas e desmatamentos são os principais fatores que desalojam as colônias de roedores e as obrigam a procurar novos ambientes, aumentando o risco de exposição do homem, pela invasão de roedores nas áreas residenciais (Pereira, 2006). A melhor forma de prevenção de infecções humanas é minimizar ou eliminar o contato com fezes e urina de roedores. O controle de roedores em torno de residências é uma boa estratégia para prevenir infecções. Evitar armazenar alimento em lugares acessíveis a estes animais, pois na maioria dos casos os indivíduos exercem atividades agrícolas e florestal (Elkhoury et al., 2005; CDC 2010; SVS 2010).

Até agora não se conhece tratamento específico, cura, nem vacina para a infecção por hantavírus. No entanto, se indivíduos infectados forem diagnosticados no início da infecção, poderão receber cuidados médicos adequados. Atualmente pacientes são direcionados para unidades de terapia intensiva, sendo entubados, com hidratação controlada e recebem terapia de oxigênio para auxiliar durante o período de complicação respiratória severa (Figueiredo et al., 2001; CDC, 2010).

1.11 Avanços e Inovações

Estudos filogenéticos mostraram sobre posição surpreendente do DNA mitocondrial de roedores selvagens comparando os grupos de hantavírus associados, sugerindo que houve uma co- evolução entre patógeno- hospedeiro durante anos (Nemirov et al., 2002) Com esses dados, acredita-se que existem indícios de que a infecção humana por hantavírus é provavelmente muito antiga (Zhao et al., 1997; Khaiboullina et al., 2005).

Com os avanços da biotecnologia, cientistas baseando-se na porção M do genoma dos principais hantavírus estudam a possibilidade de desenvolver uma vacina de DNA, com intuito de estimular respostas imune às células que serão capazes de neutralizar o vírus (Hjelle, 2002; Hooper, 2006).

Hoje através do sequenciamento genético dos genes S e M, pesquisadores sugerem a possibilidade de caracterização viral sem o isolamento em cultura celular, sendo uma forma alternativa com uma abordagem científica na identificação da espécie correta dos hantavírus (Maes et al., 2009).

Atualmente técnicas de biologia molecular estão cada vez mais próximas do trabalho de campo. Hoje é possível realizar a detecção da presença do RNA viral em amostras de animais silvestres utilizando o teste *One Step Real- time RT- PCR* em campo (Takekawa et al., 2010; Thomazelli et al., 2010). Futuramente esta técnica poderá ser aplicada também no monitoramento dos hantavirus no Brasil.

2 OBJETIVOS

Realizar a padronização da técnica de biologia molecular para detecção de hantavirus brasileiros, utilizando a técnica de *Real-time RT-PCR* baseado no sistema *SYBR Green* em amostras de roedores capturados no Estado de São Paulo.

Coletar amostras de roedores silvestres na região do Vale do Ribeira e em outras regiões do Estado de São Paulo, utilizando toda a estrutura de campo montada no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular, do Instituto de Ciências Biomédicas- II da Universidade de São Paulo para realização de testes moleculares na detecção de hantavírus.

Determinar as espécies reservatórios e as variantes virais associadas aos roedores estudados utilizando a técnica de PCR convencional e sequenciamento de DNA.

Aplicar o teste desenvolvido em soro de pacientes positivos para hantavirus e aperfeiçoar a técnica adequando-a aos equipamentos e reagentes, para avaliá-la como ferramenta no monitoramento molecular dos hantavirus no Brasil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenções das Sequências

Para selecionar a região de interesse de detecção, utilizamos sequências depositadas no banco de dados dos principais hantavirus estudados no Brasil, que estão disponíveis no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

3.2 Alinhamento das Sequências

Fez-se uma análise detalhada entre os genomas depositados no banco de dados (**Figura 2**), através do alinhamento entre as sequências de nucleotídeos utilizando o programa *BioEdit* disponível no endereço eletrônico <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/> (Hall, 1999).

Figura 2. Alinhamento do segmento S dos cinco hantavirus brasileiros.

Inicialmente foram alinhados os segmentos do gene *Small* (S), *Médium* (M) e *Large* (L). O pequeno codifica a proteína do nucleocapsídeo, o médio codifica uma poliproteína que, quando clivada, gera as duas glicoproteínas do envelope (Gn e Gc) e finalmente o segmento maior, codifica a proteína L, que revela funções de transcriptase/replicase viral (**Figura 3**). O fragmento genômico que apresentou maior similaridade entre os isolados brasileiros foi o gene S. A partir do alinhamento das sequências do gene S dos cinco hantavirus descritos no Brasil, foi possível confeccionar um único par de primers específicos para detecção de todos eles (**Tabela 2**).

Figura 3 - Esquema genômico e localização dos primers no segmento S.

Tabela 2 - Primers específicos desenhados para amplificar a região do gene S.

<i>Primer</i>	<i>Sequence (5' > 3')</i>	<i>Position*</i>	<i>Product length</i>
Jan F	CCCTGTTGGATCAACTGGTTTTG	664-686	141 bp
Jan R	TGTAATGTGCTCTTGTTAACGTCATCT	779-805	

* Annealing sites based on Araraquara virus, Juquitiba virus and Castelo dos Sonhos virus.

3.3 Controles positivos

Os controles positivos para a padronização do teste foram obtidos a partir de material cedido gentilmente pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Laboratórios de Arbovírus, sob a coordenação do Dr. Luis Tadeu Moraes Figueiredo.

3.4 Vírus e Cultura Celular

Amostras do vírus HTN007 foram propagadas em culturas de células VERO E6 (*American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA*) e utilizadas como controle positivo nos ensaios de *Real-time PCR*. As células foram cultivadas em meio MEM (*Minimal Essential Medium*) suplementado com 10% (V/V, meio de crescimento) ou 3% (V/V de meio de manutenção) acrescidos de soro fetal bovino inativado com antibióticos (60 mg/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de nistatina; Cultilab, Brasil). As células foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. A cada passagem uma alíquota de 1 mL ou 2 mL de células em suspensão infectadas (para *vessels* de 75 e 150 cm², respectivamente) foi

inoculada em monocamada com 70 a 80% de confluência após a retirada do meio de manutenção. A suspensão celular foi incubada por 90 minutos com agitação suave em intervalos de 15 minutos; posteriormente, os inóculos foram retirados e meio de manutenção foi substituído. A cada três dias, metade do meio de manutenção foi substituído. Após um período de 10 a 12 dias para cada passagem, o sobrenadante foi coletado e armazenado em ultrafreezer a -80 °C. A quantidade de 200 µL do sobrenadante foi utilizada nas extrações de RNA.

3.5 Captura dos animais

Para o trabalho de campo, foi utilizada uma estrutura montada pelo Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do ICB-II/USP adquirida com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP com o projeto Rede de Diversidade Genética Viral (VGDN- Processo 00/11511-6). O veículo Ford F-350, com tração 4X4, guincho e snorkel foi construído para uso de um verdadeiro laboratório móvel capaz de chegar em terrenos de difícil acesso. Carregando em seu interior toda estrutura necessária para realizar capturas, coleta de material biológico e processamento laboratorial *in locu*. Possui barraca laboratório, gerador *Toyama 3000 Tc*, mesas de trabalho, microcentrifuga, geladeira, *Dry Shippers* (Nitrogênio líquido) para armazenamento das amostras, gaiolas tipo Sherman e Tomahawk e máquina de *Real- time PCR* própria para o trabalho de campo (**Figura 4**).

Foram utilizadas, em cada expedição de captura, 40 armadilhas do tipo “Sherman” e 40 armadilhas do tipo Tomahawk, intercaladas em espaçamentos de 4 metros, organizadas em 2 linhas de 40 unidades. Como isca, utilizou-se uma mistura de pasta de amendoim, essência de baunilha e aveia em flocos. Em algumas situações, usou-se banana ou lingüiça calabreza defumada misturada com pasta de amendoim (*Peter Pan Creamy*). O tempo de captura foi determinado de acordo com o local de coleta. As armadilhas foram colocadas em pontos estratégicos, antes do anoitecer, e verificadas no dia seguinte, logo ao amanhecer sempre fazendo utilização de equipamentos de proteção individual como luvas e máscaras N95. As armadilhas consideradas positivas, ou seja, encontradas com roedores, foram colocadas em sacos plásticos (sacos de lixo de 20 litros), firmemente amarrados,

para evitar contaminação de nossa equipe e levados para a base de apoio até o processamento (Pereira, 2006).

Nosso trabalho analisou amostras de roedores silvestres capturados em cinco regiões distintas no Estado de São Paulo (**Figuras 5 e 6**). Em maio de 2007 e 2008 realizamos duas expedições ao Parque Estadual de Jacupiranga, região localizada no Vale do Ribeira, onde foi iniciado nosso trabalho de campo. Posteriormente, surgiu a oportunidade de analisar novas amostras em outras regiões interessantes e que foram adicionadas no trabalho. Durante o ano de 2008 e 2009, realizamos o trabalho na região de cerrado no Pontal do Paranapanema, município de Teodoro Sampaio localizado no Parque Estadual do Morro do Diabo em colaboração com o Instituto de Pesquisas Ecológicas (IPÊ). Em 2009 na região de Mata Atlântica em Nazaré Paulista. Por fim, efetuou-se um estudo retrospectivo em amostras de animais capturados na região de Mata Atlântica em Biritiba Mirim e Salesópolis no ano de 2002.

Figura 4- A- Laboratório móvel (F-350 *Vírus Buster*) utilizado nas expedições demonstrando os acessórios externos. B- Travessia em terrenos de difícil acesso. C- Barraca de apoio laboratorial. D- Estrutura laboratorial e teste molecular em campo.

Figura 5 - Localização dos locais de coleta das amostras para o estudo de hantavírus.
 Fonte: Governo do Estado de São Paulo. Secretaria de Economia e Planejamento.

Figura 6 – Foto panorâmica dos locais de coleta. A- Parque Estadual de Jacupiranga. B- Parque Nacional do Morro do Diabo (Fonte: IPÊ). C- Nazaré Paulista. D- Vista da represa de Biritiba Mirim.

Os procedimentos de captura, bem como o sacrifício, a colheita de sangue e fragmentos teciduais dos roedores capturados, estão de acordo com as resoluções da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade- ICMBio.

Os animais foram capturados utilizando armadilhas tipo Sherman (Sherman Traps Inc., Tallahassee, FL) e Tomahawk modificadas (10 x 10 x 40) (**Figura 7**). O procedimento envolvendo biometria, colheita de sangue e retirada dos órgãos, foi realizado utilizando equipamentos de proteção individual (EPIs) adequado para trabalho com roedores (**Figura 8**) ou em cabine de biocontenção (*GloveBox- Micro Iso MK II, Envair Limited*), que contém filtros especiais (*HEPA- High Efficiency Particulate Air*) para evitar possíveis contaminações ao pesquisador e ao ambiente (**Figuras 9 e 10**).

Figura 7 - Armadilhas utilizadas na captura dos roedores: (A) Sherman (B) Tomahawk.

A captura dos roedores e processamento das amostras biológicas (sangue, pulmões, coração, rins, fígado e baço) foram obtidas seguindo as recomendações do manual de biosegurança (Mills et al., 2005) e estocadas imediatamente em nitrogênio líquido. Para identificação taxonômica, as carcaças foram transportadas até o Laboratório de Ecologia Animal do Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ em Piracicaba ou enviadas para o depósito no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Figura 8- Treinamento realizado pelo Ministério da Saúde em Santa Tereza- ES para procedimentos de captura e coleta. A- EPIs utilizado no trabalho de campo; B- Desinfecção do material cirurgico utilizado na coleta com Lysol a 10%; C- Coleta de órgãos dos roedores; D- Desinfecção dos EPIs após o término do trabalho borrifando Lysol na concentração 10%.

Figura 9- Cabine de biocontenção- (Glove box) usada no trabalho de campo, com filtros de proteção para não contaminar o pesquisador e o ambiente.

Figura 10- (1) Biometria, (2) Colheita de sangue e (3) Retirada dos órgãos

Após a captura, as armadilhas passaram por um processo de desinfecção mergulhadas em um balde utilizando Lysol a 10% por 10 minutos, seguido de um banho de água e por fim foram levadas ao fogo para finalizar o processo de limpeza e descontaminação. Vale ressaltar que todas as armadilhas passam pelo mesmo processo, inclusive as armadilhas que foram negativas na captura (**Figura 11**).

Figura 11- Desinfecção das armadilhas utilizadas na captura.

3.6 Extração do material genético

Para a extração do RNA viral foi utilizado o *MagMax TM-96 RNA Isolation Kit* (Ambion, Inc., Austin, TX, USA), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA controle foi extraído a partir de 200 μ L de sobrenadante de cultura celular inoculadas com HTN007. Para extração a partir de órgãos dos roedores, 100 mg de tecido (Rim ou Pulmão) foi triturado em 400 μ L de solução de lise, que contém isotiocianato de guanidina. O material foi centrifugado a 2500 g por 25 minutos, para separação das carcaças. 100 μ L do sobrenadante foram transferidos para uma microplaca e adicionou-se o mesmo volume (100 μ L) de solução 1 contendo beads magnéticas.

Após a incubação, sob agitação, por 2 minutos a temperatura ambiente, a microplaca foi colocada sob uma placa magnética durante 1 minuto para separação do RNA (o RNA se liga as beads magnéticas). O líquido foi então removido, e promoveu-se uma lavagem adicionando 50 μ L de solução 2 (contendo etanol 100%). A placa foi submetida a uma agitação por 1 minuto a 900 g. Novamente a microplaca foi colocada sob a placa magnética por 1 minuto. O líquido foi removido e adicionou-se 100 μ L da segunda solução de lavagem (solução 2). As amostras foram novamente submetidas a agitação a 900 g por 1 minuto e posteriormente colocadas sob a placa magnética. Depois de removida toda a solução de lavagem, adicionou-se 50 μ L de tampão de eluição em cada orifício (well) e as amostras foram submetidas a nova agitação durante 3 minutos a 900 g (as beads são separadas do RNA nesta fase). Então, a microplaca foi colocada sob a placa magnética novamente, e o RNA, agora livre foi transferido para um novo microtubo e armazenado em ultrafreezer -80 °C. As amostras foram processadas no laboratório *Klaus Eberhard Stewien*, BSL 3⁺ (Biosafety Level 3) do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo (**Figuras 12 e 13**).

Figura 12- A- Desenho esquemático do laboratório *Klaus Eberhard Stewien*, BSL 3⁺ (Biosafety Level 3 (Folha se São Paulo, 2003). B- *Pass Thru* no processo de desinfecção química e luz ultravioleta utilizado na retirada de material do laboratório.

Figura 13- A- Visão Panorâmica do laboratório BLS 3⁺ B- Trabalho no fluxo laminar com amostras suspeitas. C- Cabine de Biocontenção (*Glove Box*) e Teste de *Real time PCR*. D- *Safe Box*, caixa de biocontenção utilizada para transporte de animais silvêtres.

3.7 Transcrição Reversa- RT

O cDNA foi transcrito utilizando o *High-Capacity cDNA Archive Kit* (*Applied Biosystems*), a partir de 50 µl de RNA extraído diluído em 50mM de Tris- HCl [pH 8.3], 75mM de KCl, 3mM de MgCL₂ (10X RT *Buffer*), 250U de Transcriptase Reversa (*MultiScribe*), 50 pmol de *random primers* (10X *Random primers*), 250mM de cada dNTP (25X dNTP *mixture*) e água MilliQ q.s.p. totalizando 100 µL. A mistura foi submetida a uma temperatura de 25 °C por 10 minutos, seguidos de 37 °C durante duas horas, seguindo as recomendações do fabricante. Ao final da reação as amostras foram armazenadas a -80 °C.

3.8 Real Time- PCR (Sistema SYBR Green)

O sistema *SybrGreen*, consiste em uma molécula fluorescente que intercala a dupla fita-DNA. É comumente utilizada na detecção de amplicons com tamanhos de até 250 pb (pares de bases). No presente trabalho primers foram projetados para

gerar um amplicon de 141 pb na detecção viral. As reações foram realizadas em duplicata, com volume final de 50 µL contendo 25 µL do *SYBR[®] Green PCR Master Mix 2X* (incluindo Taq DNA *polymerase*, reaction buffer, dNTP mix e *SYBR dye/Applied Biosystems*), 1µL de cada primer (5 pmol), 5 µL do cDNA e 18µL água *UltraPure*. Utilizamos as condições universais de termociclagem, sendo 50 °C por 2 minutos (Atividade da enzima Uracil-DNA-Glicosilase- UNG, que degrada todo DNA incorporado com uracila, antes de iniciar os ciclos de amplificação). Em seguida, realizou-se um passo de 95 °C por 10 minutos (inativação da UNG e ativação da *AmpliTaq Gold* DNA Polimerase) seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. O anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores ocorre durante a rampa de descida de 95 °C a 60 °C e a coleta do sinal nos 30 segundos finais da etapa de extensão (**Figura 14**).

3.9 Curva de Dissociação

Para identificação dos produtos de PCR gerados na presença do *SYBR Green*, após a amplificação, realizamos uma “Curva de Dissociação”, que consiste na análise da Temperatura de *melting* (T_m) pelo incremento da temperatura de 60 °C até 90 °C com taxa de transição linear de 0.1 °C por segundo, ao final da amplificação (**Figura 14**). A fluorescência das amostras foi monitorada continuamente enquanto a temperatura aumentava gradativamente. Como o *SYBR Green* é liberado durante a desnaturação, resultando num decréscimo do sinal de fluorescência, o software calcula a T_m, ou seja, a taxa de mudança da fluorescência sendo apresentada como uma função da temperatura.

Figura 14 - Condições universais de termociclagem utilizada na padronização.

3.10 Construção da Curva padrão

A sensibilidade e especificidade do teste foram avaliadas utilizando RNA extraído a partir de sobrenadante de cultura celular infectadas com o vírus HTN007. 200 µL de sobrenadante foram submetidos à extração do RNA viral utilizando o *MagMax TM-96 RNA Isolation Kit* (Ambion, Inc., Austin, TX, USA). Após a quantificação pelo *NanoDrop*, o RNA foi submetido a diluições seriadas na base 10 e testado por *Real-time RT-PCR* pelo sistema *SYBR Green Real-time PCR*.

3.11 RT-PCR convencional

Após a detecção de amostras positivas, utilizando o método de *Real-time PCR* utilizando o sistema *SYBR Green*, realizamos uma nova amplificação em outra região do gene S e do gene M (**Figura 15**) utilizando outros *primers* específicos (Moreli et al., 2004). Para cada reação de PCR foram utilizados 5,0 µL de Buffer 10X, 1,0 µL de dNTPs (10mM), 2,5 µL de cada *primer* SAHN-S (sense) e SAHN-C (complementar) para gene S (20 pmol), e G1/HANGn- C e G1/HANGn- S (20 pmol) para o gene M, 1µL de *Taq* DNA Polimerase (1u/µL- Biotools), 5 µL de cDNA e 33 µL de água MiliQ, totalizando um volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador 9700 (*Perkin Elmer – Applied Biosystems*). As amostras foram submetidas a 94 °C por 5 minutos e seguida de 35 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto de 3 temperaturas: desnaturação das amostras a 95 °C (30 segundos), pareamento dos *primers* a 55 °C (45 segundos) e extensão das fitas de DNA a 72 °C (60 segundos). Depois do término dos ciclos, um período de 7 minutos a 72 °C foi aplicado para a finalização das extensões ocorridas.

3.12 Purificação do produto de PCR

Para a purificação dos produtos da *RT-PCR* utilizou-se o *Concert Nucleic Acid Purification System Kit* (*Gibco BRL*), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram adicionadas às colunas de sílica e centrifugadas a 12.000g por 1 minuto a 25 °C. A seguir, as amostras foram lavadas e promoveu-se nova centrifugação a 12.000g por 1 minuto a 25 °C. Após a lavagem, adicionou-se 50µl de

água estéril, previamente aquecida a 65 °C. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugadas a 12.000g por 1 minuto a 25 °C. Os produtos foram eluídos em 50 µL de tampão de eluição (TE).

Figura 15 - Desenho esquemático da estrutura dos genes S e M dos Hantavirus. O gene S codifica a proteína do nucleocapsídeo, o M codifica uma poliproteína que, quando clivada, gera as duas glicoproteínas do envelope (Gc e Gn). As setas representam os *primers* utilizados na detecção denominados JAN-F (*forward*) e JAN-R (*reverse*) por *Real-time PCR* e para amplificação parcial dos genes utilizamos SAHN- S (*sense*) e SAHN- C (*complementar*) para S, G1/HANGn- C e G1/HANGn- S para M. As barras em cinza representam os tamanhos esperados para os fragmentos de 141, 264 e 324 pares de bases (pb) respectivamente.

3.13 Sequenciamento de DNA

Os produtos purificados da RT-PCR foram sequenciados e as sequências obtidas foram analisadas em bancos de dados (Sanger et al., 1977; Sambrook et al., 1989). Para a reação, foi utilizado 1 µL de tampão de sequenciamento (*Sequence Buffer- 5X*), 2 µL de reagente de sequenciamento *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit reagent* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 3 µL do *primer* (1,0 pmol), 2 µL de água estéril e 2 µL do produto de PCR totalizando um volume final de 10 µL. As leituras das reações foram feitas no sequenciador automático *ABI 3100* (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado nos dois sentidos, ou seja, utilizando-se os dois *primers* e repetido duas vezes, a fim de evitar possíveis erros de leitura das bases.

3.14 Alinhamento e Análise Filogenética

O alinhamento entre as sequências encontradas foi obtido com o auxílio do programa *Sequence Navigator* versão 1.0 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) para *Power Macintosh*. As sequências foram comparadas com outras existentes no *GenBank*, usando o *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* na homepage: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Matrizes de distâncias dadas em porcentagens de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos foram calculadas através do programa *MegAlign™* versão 5.03 (*DNASoft*).

As árvores filogenéticas foram construídas baseando-se no alinhamento de nucleotídeos através do método de *Neighbor-Joining* com o parâmetro indicado pelo programa *ModelTest 3.7 (PAUP 4.0b10)* (Swofford, 2002).

A consistência da filogenia foi analisada através de valores de *bootstrap*, com 1000 réplicas, para avaliação da sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas (Felsenstein, 1985).

3.15 Inovações

Recentemente, aplicamos o teste 10 em amostras de urina de roedores silvestres, colhidas em Teodoro Sampaio e colocadas imediatamente em tampão de lise. Como controle positivo foi utilizado sobrenadante de cultura celular infectadas com o HTN- 007. A extração foi realizada com o auxílio do *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (*Qiagen, Hilden, Germany*) seguindo as recomendações do fabricante. O *One Step Real-time RT-PCR* foi realizado usando o *Power SYBR® Green RNA-to-C™ One-Step Kit* (*Applied Biosystems*). Utilizando reagentes armazenados em *Dry shippers* mantidos a baixa temperatura e com auxílio de um gerador, para o funcionamento do equipamento (**Figura 16**), foi possível realizar o desafio com sucesso.

Figura 16 - *Real- time One Step RT- PCR* em campo. A- Equipamento *Smart Cycle II* (Cepheid) utilizado na padronização; B- O equipamento é acoplado ao *laptop* para análise dos dados; C- *Dry shipper* com reagentes mantidos a baixa temperatura utilizado na detecção. D- *Kit de extração* (*QIAamp Viral RNA Mini Kit*- Qiagen) usado em campo, a temperatura ambiente. E- Gerador utilizado para o *Smart Cycle II*, centrifuga e o *laptop*, em locais onde não tem energia elétrica.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização do Real- time PCR (Sistema SYBR Green)

Amostras do vírus HTN007, propagadas em cultura celular, foram utilizadas para determinar a eficiência da reação. Inicialmente foi utilizado 1.0 ng/ μ L do cDNA dos controles positivos. A concentração dos *primers* variou entre 1,0 a 20 pmol (pico moles) (**Figura 17**).

Figura 17 - Concentração dos primers utilizados na padronização do teste de detecção. A intensidade do *Sybr Green* indica o nível da amplificação.

4.1.1 Análise da Curva de Dissociação

Após o processo de amplificação, as amostras foram submetidas a Curva de Dissociação do amplicon, que representa a relação entre a temperatura e a quantidade de emissão de fluorescência da reação de PCR (com dados coletados entre 60 °C a 95 °C) (**Figura 18**).

Figura 18 - Curva de dissociação observada do controle positivo. O eixo x representa a temperatura de *melting* e o eixo Y representa a quantidade de fluorescência emitida pelos fragmentos dissociados (derivada).

Uma alta concentração de primers também favorece o aparecimento de dímeros (**Figura 19**). A leitura dos produtos amplificados foi realizada em dois diferentes equipamentos para fins comparativos: o *Smart Cycle II* (**Figura 20**) (*Cepheid, Manitoba City, CA*), que é adequado para o trabalho de campo, e o *ABI 7300 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). O T_m observado para detecção dos Hantavirus foi de aproximadamente 82,1 °C quando usado o equipamento ABI 7300 e 83,2 °C (**Figura 21**) quando usado *Smart Cycle II* (*Cepheid*).

Figura 19 - Curva de dissociação utilizada na detecção dos hantavírus no Brasil. A concentração de *primer* ideal observada foi de 5,0 pmol. A concentração de 20 pmol resultou na formação de "*primer-dimers*". O eixo y representa a intensidade da fluorescência derivada e o eixo x representa a temperatura de *melting* (T_m) dos fragmentos amplificados.

Figura 20 - Curva de amplificação do controle positivo em duplicata realizado no equipamento de campo *Smart Cycle II* (Cepheid). O eixo y do gráfico representa a intensidade de fluorescência relativa (ΔR_n) e o eixo x o C_t da reação.

Figura 21 - Curva de dissociação observada do controle positivo no equipamento de campo *Smart Cycle II* (Cepheid), O eixo x representa a temperatura de *melting* e o eixo Y representa a quantidade de fluorescência emitida. A temperatura de *melting* (T_m) observada foi de 83,2 °C.

4.1.2 Confirmação em gel de Agarose

Após a amplificação e análise dos dados, para confirmação dos resultados, as amostras foram aplicadas em gel de agarose onde foi possível visualizar bandas de aproximadamente 140 pb (**Figura 22**).

Figura 22 – Análise eletroforética em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, do controle positivo amplificado por *Real-time PCR*; M representa o peso molecular 100 *pb* DNA Ladder (Invitrogen). A seta indica os tamanhos dos fragmentos presentes amplificados. 1- Controle positivo diluído 1: 1000 (0,0001 ng), 2- Controle negativo de célula sem inoculação do vírus, 3- Controle positivo diluído 1:100 (0,01 ng) e 4- Controle positivo diluído 1:10 (0,1 ng).

4.1.3 Curva padrão, sensibilidade e especificidade do método desenvolvido

O teste de sensibilidade analítica da reação foi realizado a partir de diluições seriadas em duplicatas na base 10 do cDNA obtido de células inoculadas com o vírus HTN007 (Weidmann et al., 2003).

A quantificação do material genético foi realizada no *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (ThermoScientific) (**Figura 23**).

Figura 23 - Quantificação do material genético dos controles positivos utilizado na construção da Curva padrão.

As diluições foram efetuadas a partir de 3,0 ng/ μ L do material genético iniciando-se em 1: 10 até 1: 10000000. A Curva padrão apresentou sete pontos distintos bem definidos em cada duplicata (Figuras 24 e 25).

Figura 24 - Curva de amplificação do controle positivo em duplicatas utilizado na construção da Curva padrão. O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta Rn) e o eixo y o Ct da reação. Cada curva representa a amplificação na diluição seriada na base 10.

Foi observado que mesmo nas concentrações mais baixas (0,000003 ng) foi possível manter-se dentro da faixa de linearidade na Curva padrão, a qual teve, para todos os casos, um coeficiente de correlação superior a 0,99.

Figura 25 - Correlação da Curva Padrão. A quantidade de RNA inicial em cada reação foi de 3,0 ng, 0,3 ng, 0,03 ng, 0,003 ng, 0,0003 ng, 0,00003 ng, 0,000003 ng e seu log está representado no eixo x. O valor do Ct (*threshold cycle*) obtido para cada reação está indicado no eixo y. As diluições foram feitas em duplicatas. R2 é o coeficiente de correlação.

Quanto mais próximo de 1 o coeficiente de correlação (R2) atingir, melhor a resolução da curva. Este coeficiente é uma medida linear entre duas variáveis quantitativas. Quanto mais próximo estiver de 1, mais forte é a associação entre as duas variáveis.

A especificidade analítica da reação do método desenvolvido também foi analisada. O teste foi aplicado em amostras de RNAs virais de outros patógenos, incluindo o vírus da Febre amarela, Oropouche, Mayaro e o vírus da Dengue. No entanto, nenhum resultado positivo foi encontrado ou qualquer amplificação inespecífica (**Figuras 26 e 27**).

Figura 26 - Teste de especificidade utilizando RNA viral de outros patógenos. O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta *Rn*) e o eixo y o *Ct* da reação.

Figura 27 - Curva de Dissociação no teste de especificidade utilizando RNA viral de outros patógenos. O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta *Rn*) e o eixo y o *Ct* da reação.

4.2 Esforço amostral e Análise Molecular

Foram consideradas positivas, todas as amostras que apresentaram dois quesitos básicos: 1- Captação de fluorescência na curva de amplificação (*Ampliplo*t). 2- Confirmação do produto amplificado quando analisada a curva de Dissociação, apresentando picos de *Tm* entre 82,1 °C ou 83,2 °C dependendo do equipamento, com pequenas variações de até 0,5 °C para mais ou para menos, Todas as amostras com resultados negativos foram também testadas com outros primers para confirmação dos resultados As amostras positivas foram submetidas ao sequenciamento para sua caracterização.

4.2.1 Parque Estadual de Jacupiranga

O teste foi aplicado inicialmente em 10 amostras de rim e pulmão de roedores silvestres capturados na região do Parque Estadual de Jacupiranga no Vale do Ribeira. No entanto, não foi detectada a presença do RNA viral em nenhuma das amostras estudadas (**Tabela 3**).

Tabela 3- Roedores capturados no Parque Estadual de Jacupiranga.

Amostra	Espécie	Data	Local	Real- time PCR
1R	<i>Oligorizomys nigripes</i>	28/05/2007	Jacupiranga	NEGATIVO
2R	<i>Oligorizomys nigripes</i>	28/05/2007	Jacupiranga	NEGATIVO
3R	<i>Akodon</i> sp	28/05/2007	Jacupiranga	NEGATIVO
4R	<i>Oligorizomys nigripes</i>	28/05/2007	Jacupiranga	NEGATIVO
5R	<i>Oligorizomys nigripes</i>	29/04/2008	Jacupiranga	NEGATIVO
6R	<i>Oligorizomys nigripes</i>	30/04/2008	Jacupiranga	NEGATIVO
7R	<i>Akodon</i> sp	01/05/2008	Jacupiranga	NEGATIVO
8R	<i>Akodon</i> sp	02/05/2008	Jacupiranga	NEGATIVO
9R	<i>Akodon</i> sp	03/05/2008	Jacupiranga	NEGATIVO
10R	<i>Oligorizomys nigripes</i>	04/05/2008	Jacupiranga	NEGATIVO

4.2.2 Parque Estadual do Morro do Diabo

Outra região inserida em nosso estudo foi o Pontal do Paranapanema, no Parque do Morro do Diabo, em colaboração com o grupo do Instituto de Pesquisas Ecológicas (IPÊ) realizamos a captura de 27 roedores (*Akodon* sp.) no período de Janeiro, Março e Maio de 2008. Foram analisadas amostras de urina, rim e pulmão destes animais, mas nenhum resultado positivo foi encontrado (**Tabela 4**).

Tabela 4- Roedores silvestres capturados no Parque Estadual do Morro do Diabo.

Amostra	Espécie	Data	Local	Real- time PCR
12TS	<i>Akodon</i> sp.	15/05/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
13TS	<i>Akodon</i> sp.	16/05/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
14TS	<i>Akodon</i> sp.	16/05/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
15TS	<i>Akodon</i> sp.	16/05/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
16TS	<i>Akodon</i> sp.	17/05/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
23TS	<i>Akodon</i> sp.	17/05/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
24TS	<i>Akodon</i> sp.	17/05/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
25TS	<i>Akodon</i> sp.	17/05/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
26TS	<i>Akodon</i> sp.	18/05/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
31TS	<i>Akodon</i> sp.	18/05/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
32TS	<i>Akodon</i> sp.	18/05/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
33TS	<i>Akodon</i> sp.	18/05/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR1	<i>Akodon</i> sp.	20/01/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR2	<i>Akodon</i> sp.	20/01/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR3	<i>Akodon</i> sp.	20/01/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR4	<i>Akodon</i> sp.	20/01/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR5	<i>Akodon</i> sp.	20/01/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR6	<i>Akodon</i> sp.	21/01/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR7	<i>Akodon</i> sp.	21/01/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR8	<i>Akodon</i> sp.	21/01/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR9	<i>Akodon</i> sp.	21/01/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR10	<i>Akodon</i> sp.	05/03/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR11	<i>Akodon</i> sp.	05/03/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR12	<i>Akodon</i> sp.	05/03/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR13	<i>Akodon</i> sp.	05/03/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR14	<i>Akodon</i> sp.	05/03/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO
SZR15	<i>Akodon</i> sp.	05/03/2008	Teodoro Sampaio	NEGATIVO

No mesmo período, realizamos uma análise em 34 amostras de roedores domésticos (*Rattus ratus* e *M. musculus*) que foram capturados em maio de 2008 (**Tabela 5**). Estes animais foram capturados dentro de residências e armazéns de um assentamento na região de Teodoro Sampaio em local próximo a plantações de cana-de-açúcar e cultura de subsistência. Todas as amostras também apresentaram resultados negativos na análise.

Tabela 5- Relação de roedores domésticos capturados em residências próximas ao Parque Estadual do Morro do Diabo.

Amostra	Espécie	Data	Local	Real- time PCR
R.01	<i>Rattus rattus</i>	20/05/2008	Córrego Seco- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.02	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Córrego Seco- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.03	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Córrego Seco- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.04	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Córrego Seco- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.05	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Córrego Seco- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.06	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Córrego Seco- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.07	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Córrego Seco- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.08	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Córrego Seco- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.09	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Córrego Seco- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.10	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Córrego Seco- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.11	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Córrego Seco- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.12	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Córrego Seco- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.13	<i>M. musculus</i>	20/05/2008	Santa.Zélia- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.14	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Tucano- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.15	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Tucano- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.16	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Tucano- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.17	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Tucano- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.18	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Tucano- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.19	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Tucano- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.20	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Tucano- Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.21	<i>R. rattus</i>	20/05/2008	Tucano- T12-Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.22	<i>R. rattus</i>	20/05/2008	Tucano-T1-Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.23	<i>R. rattus</i>	20/05/2008	Tucano-T1-Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.24	<i>R. rattus</i>	20/05/2008	Tucano- T12-Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.25	<i>M. musculus</i>	20/05/2008	Tucano- T12-Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.26	<i>M. musculus</i>	20/05/2008	Tucano- T12-Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.27	<i>M.musculus</i>	20/05/2008	Tucano- T12-Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.28	<i>R. rattus</i>	20/05/2008	Tucano- T12-Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.29	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Tucano- T12-Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.30	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Tucano- T12-Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.31	<i>M.musculus</i>	20/05/2008	Tucano- T12-Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.32	<i>R.rattus</i>	20/05/2008	Tucano-T1-Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.33	<i>M.musculus</i>	20/05/2008	Tucano- T12-Teodoro Sampaio	NEGATIVO
R.34	<i>M.musculus</i>	20/05/2008	Tucano- T12-Teodoro Sampaio	NEGATIVO

4.2.3 Região de Mata Atlântica em Biritiba Mirim e Salesópolis

Amostras colhidas no ano de 2002 na região de Biritiba Mirim e Salesópolis também foram acrescentadas em nosso estudo (**Figura 28**).

Figura 28- Detecção molecular de hantavirus em amostras de roedores silvestres capturados em Biritiba Mirim, Estado de São Paulo, Brasil.

No total 55 amostras de roedores silvestres foram analisadas (**Tabela 6**). Analisando pulmões e rins destes animais, foi possível detectar a presença dos hantavirus em 10 amostras estudadas, sendo: 4 *Oligoryzomys* sp., 1 *Oryzomys* sp., 1 *Akodon* sp., 2 *Akodon montensis*, 1 *Thaptomys nigrita* e 1 *Juliomys* sp. (**Tabela 7**).

Tabela 6 - Roedores capturados em Biritiba Mirim e Salesópolis no ano de 2002. (Continua)

Amostra	Espécie	Data	Local	Real- time PCR
2000	<i>Akodon</i> sp.	07/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2006	<i>Akodon</i> sp.	02/05/2020	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2017	<i>Oryzomys</i> sp.	06/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2022	<i>Oligorizomys nigripes</i>	06/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2032	<i>Oryzomys</i> sp.	07/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2034	-	07/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2035	<i>Oligorizomys nigripes</i>	07/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2036	<i>Oligorizomys nigripes</i>	07/05/2002	Biritiba Mirim-SP	POSITIVO
2037	<i>Akodon montensis</i>	07/05/2002	Biritiba Mirim-SP	POSITIVO
2038	-	07/05/2002	Salesópolis - SP	NEGATIVO
2039	<i>Akodon montensis</i>	07/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2040	<i>Oligorizomys nigripes</i>	07/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2041	<i>Oligorizomys nigripes</i>	07/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2043	-	07/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2062	<i>Oligorizomys nigripes</i>	08/05/2002	Biritiba Mirim-SP	POSITIVO
2063	<i>Akodon montensis</i>	08/05/2002	Biritiba Mirim-SP	POSITIVO
2064	<i>Oligorizomys nigripes</i>	08/05/2002	Biritiba Mirim-SP	POSITIVO
2065	<i>Akodon</i> sp.	07/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2067	<i>Akodon</i> sp..	09/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2068	<i>Oligorizomys nigripes</i>	09/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2069	<i>Oligorizomys nigripes</i>	09/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2070	<i>Oligorizomys nigripes</i>	09/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2071	<i>Akodon montensis</i>	09/05/2002	Biritiba Mirim-SP	POSITIVO
2073	<i>Akodon montensis</i>	09/05/2002	Biritiba Mirim-SP	POSITIVO
2116	<i>Oligorizomys nigripes</i>	11/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2132	<i>Thaptomys nigrita</i>	12/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2136	<i>Oryzomys</i> sp.	14/05/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2144	<i>Akodon montensis</i>	01/09/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2145	<i>Oryzomys</i> sp.	01/09/2002	Biritiba Mirim-SP	POSITIVO
2146	<i>Akodon montensis</i>	01/09/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2147	<i>Akodon montensis</i>	01/09/2002	Salesópolis - SP	NEGATIVO
2278	<i>Oligorizomys nigripes</i>	02/09/2002	Salesópolis - SP	NEGATIVO
2305	<i>Akodon montensis</i>	03/09/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2306	<i>Thaptomys nigrita</i>	03/09/2002	Biritiba Mirim-SP	POSITIVO
2312	<i>Oligorizomys nigripes</i>	05/09/2002	Salesópolis - SP	NEGATIVO

Tabela 6 - Roedores capturados em Biritiba Mirim e Salesópolis no ano de 2002. (Conclusão)

2313	<i>Akodon montensis</i>	05/09/2002	Salesópolis - SP	NEGATIVO
2315	<i>Oligorizomys nigripes</i>	05/09/2002	Biritiba Mirim-SP	POSITIVO
2317	-	07/09/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2335	<i>Oligorizomys nigripes</i>	07/09/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2336	<i>Juliomys</i> sp..	07/09/2002	Biritiba Mirim-SP	POSITIVO
2359	<i>Akodon</i> sp.	07/09/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2360	<i>Oligorizomys</i> sp.	07/09/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2361	<i>Oligorizomys nigripes</i>	07/12/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2362	<i>Oligorizomys nigripes</i>	07/09/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2368	<i>Oryzomys</i> sp.	07/12/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2429	-	09/12/2002	Salesópolis - SP	NEGATIVO
2430	<i>Juliomys</i> sp.	09/12/2002	Salesópolis - SP	NEGATIVO
2431	<i>Nectomys squamipes</i>	09/12/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2461	<i>Akodon montensis</i>	09/12/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2462	<i>Akodon montensis</i>	09/12/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2463	<i>Nectomys squamipes</i>	09/12/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2464	<i>Delomys</i> sp.	10/12/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2482	<i>Oryzomys</i> sp.	10/12/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2483	<i>Akodon</i> sp.	10/12/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO
2519	<i>Nectomys squamipes</i>	12/12/2002	Biritiba Mirim-SP	NEGATIVO

(-) Amostra sem identificação

Tabela 7 - Detecção do vírus em roedores silvestres por *Real-time RT-PCR* em Biritiba Mirim.

Espécies	N° de positivos/N° testados	(%)	Tecidos testados
<i>Akodon montensis</i>	3/19	16	Rins e Pulmões
<i>Delomys</i> sp.	0/1	0	Rins e Pulmões
<i>Juliomys</i> sp.	1/2	50	Rins
<i>Nectomys squamipes</i>	0/3	0	Rins e Pulmões
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	4/21	19	Rins e Pulmões
<i>Oryzomys</i> sp.	1/7	14	Pulmões
<i>Tapthomys nigrita</i>	1/2	50	Pulmões
Total	10/55	18	

4.2.4 Região de Mata Atlântica em Nazaré Paulista

Nesta ocasião foi possível capturar 16 animais em apenas um dia de coleta, usando 40 armadilhas do tipo Sherman, sendo: 12 *Akodon cursor*, 2 *Oligoryzomys nigripes* e 2 *Necromys lasiurus* em um fragmento de Mata Atlântica próximo às fazendas da região, representando uma positividade amostral de coleta de 40%. O teste foi aplicado em amostras de urina e rins coletadas destes animais (**Tabela 8**). Nesta análise obtivemos 4 amostras positivas detectadas pelo método, sendo 3 *Akodon cursor* e 1 *Oligoryzomys nigripes*.

Tabela 8- Relação de animais capturados e amostras positivas na região de Nazaré Paulista.

Amostra	Espécie	Data	Local	Material testado	Real- time PCR
R01	<i>Akodon cursor</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins	NEGATIVO
R02	<i>Akodon cursor</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins e urina	POSITIVO
R03	<i>Akodon cursor</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins	NEGATIVO
R04	<i>Akodon cursor</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins e urina	POSITIVO
R05	<i>Akodon cursor</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins e urina	NEGATIVO
R06	<i>Necromys lasiurus</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins e urina	NEGATIVO
R07	<i>Akodon cursor</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins e urina	NEGATIVO
R08	<i>Akodon cursor</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins e urina	POSITIVO
R09	<i>Akodon cursor</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins e urina	NEGATIVO
R10	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins e urina	POSITIVO
R11	<i>Akodon cursor</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins e urina	NEGATIVO
R12	<i>Necromys lasiurus</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins e urina	NEGATIVO
R13	<i>Akodon cursor</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins	NEGATIVO
R14	<i>Akodon cursor</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins	NEGATIVO
R15	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins e urina	NEGATIVO
R16	<i>Akodon cursor</i>	18/05/2009	Nazaré Paulista	Rins e urina	NEGATIVO

4.2.5 Real-time RT-PCR em soros humanos

Nosso estudo acrescentou-se amostras de 27 soros de pacientes com sorologia positiva para hantavirus provenientes de Minas Gerais (**Figura 29**), enviadas ao nosso laboratório para aplicação do teste molecular. As amostras foram primeiramente analisadas por testes sorológicos para IgG e IgM reativo, pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED)- MG e posteriormente analisamos por *Real-time RT- PCR*, onde encontramos 22 amostras positivas (**Tabela 9**).

Figura 29 - As regiões circuladas no mapa representam os locais onde foi detectada a presença do vírus, através do teste de *Real-time PCR*, em soro de pacientes com suspeita de hantavirose no Estado de Minas Gerais.

Tabela 9 - Relação soros de pacientes testados para hantavírus na região de Minas Gerais.

Amostra	Data	Local	<i>Real-time PCR</i>	Hantavírus
32	15/01/2009	São Sebastião do Paraíso	POSITIVO	Juquitiba
46	22/01/2009	Patrocínio	POSITIVO	Juquitiba
69	03/02/2009	Nova Serrana	POSITIVO	-
161	19/03/2009	Divinópolis	POSITIVO	-
169	20/03/2009	Passos	POSITIVO	Araraquara
184	25/03/2009	Uberlândia	NEGATIVO	-
203	01/04/2009	Belo Horizonte	POSITIVO	-
213	03/04/2009	Teófilo Otoni	POSITIVO	Araraquara
237	15/04/2009	Passos	NEGATIVO	-
254	23/04/2009	Uberaba	NEGATIVO	-
256	27/04/2009	Uberlândia	POSITIVO	Araraquara
268	04/05/2009	Uberaba	POSITIVO	Juquitiba
274	04/05/2009	Uberaba	POSITIVO	Araraquara
292	08/05/2009	Passos	POSITIVO	Juquitiba †
305	12/05/2009	Uberlândia	POSITIVO	Araraquara
348	20/05/2009	Uberlândia	NEGATIVO	- †
389	25/05/2009	Uberaba	POSITIVO	Juquitiba
395	05/06/2009	Patos de Minas	POSITIVO	Araraquara
417	30/06/2009	São Tomás de Aquino	POSITIVO	Araraquara
420	08/07/2009	Uberaba	POSITIVO	Araraquara
452	14/07/2009	Patrocínio	POSITIVO	Juquitiba
461	27/07/2009	Sete Lagoas	POSITIVO	Araraquara †
462	29/07/2009	Piumhi	POSITIVO	Araraquara
463	17/08/2009	Pains	POSITIVO	-
511	19/08/2009	Patrocínio	POSITIVO	Juquitiba
538	25/08/2009	Uberlândia	POSITIVO	-
539	25/08/2009	Uberlândia	NEGATIVO	-

(-) Não seqüenciada (†) óbito

4.3 Amostras positivas provenientes de Biritiba Mirim

4.3.1 RT- PCR convencional

As amostras positivas detectadas na região de Biritiba Mirim foram submetidas a novos testes, utilizando o mesmo cDNA utilizado no diagnóstico por *Real- time PCR*. A amplificação de outra região conservada do gene S (**Figura 30**) e do gene M (**Figura 31**) foi obtida utilizando outros *primers* específicos.

Figura 30- Análise eletroforética em gel de agarose 1,5%, dos produtos amplificados do segmento S de amostras de Biritiba Mirim após a purificação. M- 100 pb DNA *Ladder* (Fermentas). A seta indica os fragmentos amplificados de 264 pb. Como controle negativo foi utilizado cultura celular sem inoculação do vírus (C-). C+/Célula- utilizamos cultura celular inoculada com o HTN007. A reação de ambos os controles foram aplicados em gel separado. A montagem da foto foi realizada para apresentação do resultado obtido.

Figura 31 - Análise eletroforética em gel de agarose 1,5%, apresentando os fragmentos amplificados do gene M purificados de amostras de Biritiba Mirim. M representa o peso molecular de 100 pb DNA *Ladder* (Fermentas). A seta indica os fragmentos amplificados de 324 pb. Como controle negativo foi utilizado cultura celular sem inoculação do vírus (C-). Como controle positivo, utilizamos cultura celular inoculada com HTN007, congeladas em trizol.

4.3.2 Análise de sequências e Filogenia

As sequências foram alinhadas e comparadas com outras no banco de dados (**Figura 32**), gerando uma tabela (**Tabela 10**) de similaridade entre nucleotídeos e aminoácidos das amostras estudadas (Raboni et al., 2005). O alinhamento parcial do segmento S demonstrou pequenas diferenças entre os hantavírus encontrados em Biritiba Mirim e outras sequências depositadas no *GenBank*. As amostras formaram um cluster, revelando entre 88% a 95% de similaridade com o gene S do ARAV. Apenas uma amostra de *O. nigripes* (23) foi segregada em um clado diferente do ARAV e apresentou 88,3% de semelhança com JUQV (**Figura 33**). As sequências foram depositadas no *GenBank* nos seguintes números de acessos: *O. nigripes* 23 (FJ402967); *O. nigripes* 36 (FJ402971); *O. nigripes* 62 (FJ402974); *A. montensis* 63 (FJ402975); *O. nigripes* 64 (FJ402976); *Thaptomys nigrita* (FJ402977); *Juliomys* sp. (FJ402978); *Oryzomys* sp. (FJ402979); *A. montensis* 71 (FJ402981); e *A. montensis* 73 (FJ402982) (**Tabela 10**).

	10	20	30	40	50	60	70	
<i>Castelo dos Sonhos</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Annajataba</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>HTN007</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Positive Control Cell</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Jaquitiba</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Rio Hamare</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>O. nigripes 23 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Araraquara</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>A. montensis 63 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>A. montensis 71 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>A. montensis 73 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>O. nigripes 36 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>O. nigripes 62 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>O. nigripes 64 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Jalloups sp. (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Thaptomys nigrita (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Oryzomys sp. (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
	110	120	130	140	150	160	170	
<i>Castelo dos Sonhos</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Annajataba</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>HTN007</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Positive Control Cell</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Jaquitiba</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Rio Hamare</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>O. nigripes 23 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Araraquara</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>A. montensis 63 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>A. montensis 71 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>A. montensis 73 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>O. nigripes 36 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>O. nigripes 62 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>O. nigripes 64 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Jalloups sp. (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Thaptomys nigrita (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Oryzomys sp. (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
	210	220	230	240	250	260		
<i>Castelo dos Sonhos</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Annajataba</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>HTN007</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Positive Control Cell</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Jaquitiba</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Rio Hamare</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>O. nigripes 23 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Araraquara</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>A. montensis 63 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>A. montensis 71 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>A. montensis 73 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>O. nigripes 36 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>O. nigripes 62 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>O. nigripes 64 (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Jalloups sp. (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Thaptomys nigrita (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A
<i>Oryzomys sp. (BR)</i>	U	A	G	A	A	T	C	A

Figura 32- Comparação da sequência de nucleotídeos parcial do segmento S dos hantavirus encontrados em Biritiba Mirim (São Paulo, Brasil) com outras sequencias depositadas no *GenBank*. HTN007 foi o controle positivo de célula utilizado durante todo o estudo. O alinhamento foi realizado pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 6.0.7.

Tabela 10- Comparação da similaridade (%) entre nucleotídeos (acima da diagonal) a aminoácidos (abaixo da diagonal) de 264-nt da região da ORF (*Open Read Frame*) do segmento S dos hantavirus de roedores provenientes de Biritiba Mirim, São Paulo com outras depositadas no *GenBank*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	Sequences/ accession numbers	
1	-	87.2	84.2	80.0	81.1	80.8	80.8	80.0	80.8	81.5	81.1	81.5	81.5	81.5	76.5	98.5	81.1	1	HTN007(AF133234)
2	89.9	-	83.0	78.9	83.4	80.8	82.6	82.6	82.6	82.6	81.1	82.6	82.6	82.6	77.3	87.2	82.3	2	Rio Mamoré (U52136)
3	86.7	85.5	-	81.9	81.1	81.9	81.9	81.5	81.9	82.6	81.5	82.3	82.3	82.3	78.4	83.4	81.9	3	Anajatuba (DQ451829)
4	82.5	81.4	84.4	-	81.1	83.4	80.8	80.0	80.8	81.5	82.6	81.1	81.1	81.1	77.7	79.2	80.8	4	Castelo dos Sonhos (AF307324)
5	83.6	85.9	83.6	83.6	-	82.6	94.0	93.2	94.0	95.5	87.9	95.5	95.5	95.5	87.9	81.1	95.1	5	Araraquara (EF571895).
6	83.3	83.3	84.4	85.9	85.1	-	81.9	81.1	81.9	82.3	88.3	82.3	82.3	82.3	78.4	80.8	81.9	6	Juquitiba (EF492472)
7	83.3	85.1	84.4	83.3	96.5	84.4	-	99.2	100	97.7	88.7	97.7	97.7	97.7	90.2	80.8	97.4	7	<i>A. montensis</i> 63 (FJ402975)
8	82.5	85.1	84.0	82.5	95.7	83.6	99.8	-	99.2	97.0	87.9	97.0	97.0	97.0	89.4	80.0	96.6	8	<i>A. montensis</i> 71 (FJ402981)
9	83.3	85.1	84.4	83.3	96.5	84.4	100	99.8	-	97.7	88.7	97.7	97.7	97.7	90.2	80.8	97.4	9	<i>A. montensis</i> 73 (FJ402982)
10	84.0	85.1	85.1	84.0	98.0	85.8	99.1	99.0	99.1	-	89.8	99.2	99.2	99.2	92.4	81.5	98.9	10	<i>Juliomys</i> sp. (FJ402978)
11	83.6	83.6	85.1	85.1	90.4	90.8	91.2	90.4	91.2	92.3	-	89.1	89.1	89.1	84.5	81.1	88.7	11	<i>O. nigripes</i> 23 (FJ402967)
12	84.0	85.1	85.8	83.6	98.0	85.8	99.1	99.0	99.1	99.8	91.6	-	100	100	91.7	81.5	98.9	12	<i>O. nigripes</i> 36 (FJ402971)
13	84.0	85.1	85.8	83.6	98.0	85.8	99.1	99.0	99.1	99.8	91.6	100	-	100	91.7	81.5	98.9	13	<i>O. nigripes</i> 62 (FJ402974)
14	84.0	85.1	85.8	83.6	98.0	85.8	99.1	99.0	99.1	99.8	91.6	100	100	-	91.7	81.5	98.9	14	<i>O. nigripes</i> 64 (FJ402976)
15	79.0	79.8	80.9	80.2	90.4	80.9	92.7	91.9	92.7	94.9	87.0	94.2	94.2	94.2	-	77.3	91.3	15	<i>Oryzomys</i> sp. (FJ402979)
16	100	89.9	85.9	81.7	83.6	83.3	82.5	82.5	82.5	84.0	83.6	84.0	84.0	84.0	79.0	-	81.1	16	Positive Control Cell
17	83.6	85.8	84.4	83.3	97.6	84.4	98.8	98.9	98.8	99.6	91.2	99.6	99.6	99.6	93.9	82.5	-	17	<i>Thaptomys nigrita</i> (FJ402977)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	-

Figura 33 - Dendrograma da sequência parcial do segmento S (264-nt) dos hantavirus examinados neste estudo (Biritiba Mirim) e outros isolados relacionados. A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa PAUP 4.0b10, algoritmo *Neighbor-Joining* com parâmetro HKY indicado pelo *modelTest*. O *Bootstrap* >50 % foi obtido em análise de 1000 réplicas, e estão apresentadas nos pontos de ramificação. As sequências estudadas neste trabalho (número de acesso) foram: *O. nigripes* 23 (FJ402967), *O. nigripes* 36 (FJ402971), *O. nigripes* 62 (FJ402974), *A. montensis* 63 (FJ402975), *O. nigripes* 64 (FJ402976), *Thaptomys nigrita* (FJ402977), *Juliomys* sp. (FJ402978), *Oryzomys* sp. (FJ402979), *A. montensis* 71 (FJ402981), *A. montensis* 73 (FJ402982). As sequências incluídas na análise foram (número de acesso no GenBank): Anajatuba (DQ451829), Rio Mamoré (U52136), HTN-007 (AF133254), ARAV (EF571895), JUQV (EF492472), CASV (AF307324). Em azul está representado a amostra associada ao JUQV e em vermelho as amostras associadas ao ARAV.

Com relação ao segmento M, não obtivemos o mesmo sucesso no sequenciamento de todas as amostras. Apenas em cinco amostras foi possível analisar a região de interesse. As sequências foram alinhadas com outras depositadas no *GenBank* pelo programa *Sequence Navigator* (Applied Biosystems), sendo construído um dendrograma utilizando os programas *MegAlign* e *PAUP*10*

(Figura 34). Quatro destas revelaram uma porcentagem entre 84% a 92% de similaridade com ARAV e somente a amostras de *O. nigripes* (23) apresentou 83% de semelhança com JUQV novamente (Tabela 11).

Figura 34- Dendrograma da sequência parcial do segmento M (324- nt) dos hantavirus examinados neste estudo (Biritiba Mirim) e outros isolados relacionados de diferentes localidades. A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa PAUP 4.0b10, algoritmo *Neighbor-Joining* com parâmetro Tamuraneii indicado pelo programa *modelTest*. As sequências incluídas na análise são: Anajatuba (DQ451829), Rio Mamoré (U52136), HTN-007 (AF133254), ARAV (EF571895), JUQV (EF492472), CASV (AF307324), Laguna Negra (AF0057281) Hantaan (U381771), Prospect Hill (X55129.1), Puumala (AB297666.2), Cano Delgadito (DQ2844511), New York (U368031), Convict Creek (L334741), Sin Nombre (L257831), Andes (AF3249012), Bayou (L36930.1), Lechiguana (AF0280221). Em azul está representado a amostra associada ao JUQV e em vermelho as amostras associadas ao ARAV.

Tabela 11 - Comparação da similaridade (%) entre nucleotídeos (acima da diagonal) a divergência (abaixo da diagonal) de 324- nt da região da ORF (*Open Read Frame*) do segmento M dos hantavirus de roedores provenientes de Biritiba Mirim, São Paulo com outras depositadas no *GenBank*.

		Percent Identity																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
Divergence	1		77.1	77.7	76.8	78.3	78.6	77.4	64.1	82.7	78.0	81.1	73.4	78.3	76.8	76.8	74.0	70.9	71.8	81.4	77.4	71.8	82.7	1	Andes
	2	27.8		72.8	74.0	78.3	78.3	71.5	57.6	79.9	76.8	79.6	74.3	78.6	91.6	91.6	87.9	68.7	68.1	75.5	71.2	84.5	75.2	2	Araraquara
	3	26.7	34.4		73.4	73.7	75.9	73.7	61.3	75.9	75.5	74.3	74.9	73.1	74.3	74.3	71.5	69.3	66.6	77.7	74.9	69.7	75.5	3	Bayou
	4	27.9	32.3	34.1		74.3	74.3	78.0	64.1	74.9	76.8	78.3	75.2	73.4	72.4	72.4	71.2	71.8	70.0	78.0	76.2	69.7	75.9	4	CanoDelgadito
	5	26.2	26.3	32.7	31.8		80.5	74.3	59.8	83.6	79.3	84.2	73.7	78.3	80.5	80.5	78.0	71.2	69.7	79.3	73.7	75.5	79.3	5	CastelodosSonhos
	6	25.4	25.8	29.4	31.9	22.9		74.0	63.8	82.7	77.7	78.9	76.8	81.7	77.1	77.1	74.3	70.0	67.8	83.9	75.2	72.8	94.1	6	ControlePositivo
	7	27.2	36.4	33.0	26.1	31.7	33.8		62.5	76.5	74.9	78.3	81.7	71.5	70.9	70.9	70.0	70.9	71.2	76.5	89.8	67.8	77.1	7	ConvictCreek107
	8	53.3	52.5	57.1	58.4	60.6	55.5	60.1		65.0	64.7	63.2	55.1	60.7	65.3	65.3	63.8	64.1	61.0	64.7	62.5	61.3	65.9	8	Hantaan
	9	20.1	23.7	29.3	30.8	18.8	19.9	29.5	51.9		79.6	84.2	77.1	83.6	82.7	82.7	79.3	70.6	69.3	85.8	78.0	77.4	82.7	9	Juquitiba
	10	26.3	28.3	29.7	27.9	24.6	26.9	32.1	52.6	24.1		78.3	71.2	73.7	76.5	76.5	73.1	71.5	70.9	83.3	75.9	71.5	76.5	10	LagunaNegra
	11	22.0	24.1	31.6	25.8	18.1	25.1	25.8	55.8	17.8	25.7		77.1	78.3	80.2	80.2	77.7	71.8	71.2	81.4	77.4	75.9	79.9	11	Lechiguana
	12	33.5	31.8	31.1	30.2	32.8	28.0	21.3	57.2	27.6	37.0	27.5		75.2	72.1	72.1	70.3	68.7	67.2	74.6	81.7	68.1	75.9	12	NewYork
	13	26.1	25.5	34.2	34.3	26.0	21.1	36.4	58.8	18.8	32.8	25.9	30.5		78.0	78.0	75.5	67.5	67.8	79.3	74.0	73.7	80.2	13	Oligoryzomys nigripes 23
	14	28.3	9.1	31.7	34.9	23.1	27.7	37.3	49.5	19.8	28.8	23.2	35.3	26.5		100.0	96.3	69.0	66.6	77.7	70.3	92.9	74.9	14	Oligoryzomys nigripes 36
	15	28.3	9.1	31.7	34.9	23.1	27.7	37.3	49.5	19.8	28.8	23.2	35.3	26.5	0.0		96.3	69.0	66.6	77.7	70.3	92.9	74.9	15	Oligoryzomys nigripes 62
	16	32.5	13.4	36.2	38.4	26.6	31.9	39.8	52.6	24.5	34.0	27.7	38.5	30.3	3.8	3.8		67.2	64.4	74.9	69.7	96.6	72.4	16	Oligoryzomys nigripes 64
	17	37.0	41.6	40.5	35.8	36.4	38.4	36.9	54.5	38.5	35.8	35.8	40.5	43.3	41.1	41.1	44.4		74.0	70.3	71.2	65.6	71.5	17	ProspectHill
	18	34.4	40.1	44.1	37.5	39.7	40.6	36.4	58.4	38.0	37.0	36.5	41.8	40.5	43.1	43.1	47.0	32.1		70.6	71.2	62.8	68.1	18	Puumala
	19	21.5	29.9	26.5	26.3	24.6	18.4	28.5	51.0	16.0	19.1	21.6	31.2	24.5	26.7	26.7	31.8	38.1	36.5		75.9	72.8	86.1	19	RioMamore
	20	27.1	36.8	30.8	29.1	32.7	30.3	11.2	57.1	27.6	30.6	27.2	21.2	32.2	38.4	38.4	41.5	36.4	37.4	29.3		67.8	77.4	20	SinNombre
	21	35.9	17.6	39.4	41.1	30.2	34.4	43.7	54.4	27.1	36.6	30.4	42.2	33.2	7.5	7.5	3.5	46.1	50.0	34.3	45.0		70.6	21	Tapthomys nigrita
	22	19.8	30.2	29.8	29.4	24.6	6.1	29.0	53.1	20.0	28.6	23.7	29.4	23.2	30.8	30.8	35.2	35.9	40.6	15.6	27.1	38.3		22	HTN
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		

4.4 Análise das amostras positivas provenientes de Nazaré Paulista

4.4.1 Real-time RT- PCR

No município de Nazaré Paulista, o teste foi aplicado em amostras de rins e urina de roedores silvestres capturados em região de Mata Atlântica. Após a reação de *Real-time PCR* (**Figura 35**), os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose (**Figura 36**). Foram consideradas positivas as amostras número 2, 4, 8 e 10. Com relação a amostra número 11, foi observado que esta ficou um pouco abaixo do tamanho esperado, porém quando observamos a curva de dissociação, foi possível diferenciá-la (**Figura 37**).

Figura 35- Curva de amplificação (*Ampliplo*) das amostras analisadas provenientes de urina de roedores capturados em Nazaré Paulista. O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta *Rn*) e o eixo y o *Ct* da reação. As amostras clínicas são observadas nos ciclos (*Ct* entre 34 a 39).

4.4.2 Análise em gel de agarose

Figura 36- Análise eletroforética em gel de agarose 2,0 %, dos produtos amplificados por *Real-time PCR* de amostras de Nazaré Paulista. M- 100 pb DNA *Ladder* (Fermentas). A seta indica os fragmentos amplificados de 141 pb. Os números de 2 a 12 representam as amostras de urina dos roedores testados. 1- Controle negativo.

4.4.3 Análise da Curva de Dissociação

A curva de dissociação é imprescindível para análise dos resultados. Analisando o gráfico, foi possível separar as amostras consideradas positivas de produtos indesejáveis. A amostra número 11, que apresentou amplificação e foi observada em gel de agarose, poderia ser considerada positiva, entretanto, quando analisada sua curva de dissociação, foi excluída e considerada negativa (**Figura 37**).

Figura 37- Análise da Curva de Dissociação das amostras de Nazaré Paulista. O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (ΔRn) e o eixo y o Ct da reação.

4.4.4 Sequenciamento

O teste apresentou sensibilidade na detecção, porém não obtivemos amplificação utilizando outros primers descritos. Diversas tentativas de amplificação foram realizadas, alterando protocolo e reagentes, mas não obtivemos sucesso de amplificação. No entanto, foi possível sequenciar utilizando os mesmos *primers* da *Real-time* para confirmação e caracterização viral. Analisando o alinhamento da amostras número 10 (*Oligoryzomys nigripes*) com outras sequencias dos cinco hantavirus depositadas no *GenBank*, observamos uma semelhança de 99% com o JUQV (**Tabela 12**).

Tabela 12- Comparação da similaridade (%) entre nucleotídeos (acima da diagonal) a divergência (abaixo da diagonal) de 141- nt do segmento S da amostra número 10 (*Oligoryzomys nigripes*) detectada em Nazaré Paulista com outras depositadas no *GenBank*.

Percent Identity									
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Divergence	1	95.8	88.7	91.5	91.5	92.3	100.0	90.8	1
	2	4.4	89.4	94.4	93.0	93.7	95.8	92.3	2
	3	12.4	11.5	90.1	89.4	88.7	88.7	90.1	3
	4	9.0	5.9	10.6	94.4	90.8	91.5	94.4	4
	5	9.0	7.4	11.5	5.9	91.5	91.5	99.3	5
	6	8.4	6.7	12.3	9.9	9.1	92.3	92.3	6
	7	0.0	4.4	12.4	9.0	9.0	8.4	90.8	7
	8	9.9	8.2	10.7	5.9	0.7	8.3	9.9	8
	1	2	3	4	5	6	7	8	
	Rio Mamore HTN007 Anajatuba Araraquara Castelo dos Sonhos Juquitiba Laguna Negra Controle Positivo Oligoryzomys 10								

O dendrograma foi construído utilizando sequências depositadas no *GenBank* dos outros cinco hantavirus descritos no Brasil. Os números de acesso das sequencias incluídas na análise são: Anajatuba (DQ451829), Rio Mamoré (U52136), HTN-007 (AF133254), ARAV (EF571895), JUQV (EF492472), CASV (AF307324) e Laguna Negra (AF005727) (**Figura 38**).

Figura 38 - Dendrograma construído a partir da sequência parcial do segmento S (141- nt) obtida de *Oligoryzomys nigripes* capturado em Nazaré Paulista com outros isolados relacionados.

4.5 Análise das amostras de soro humano

Do total de 27 soros de pacientes, com suspeita de hantavirose, foi possível detectar a presença do RNA viral em 22 amostras. Neste mesmo caso, não conseguimos amplificar com outros primers descritos em literatura. Diversas tentativas alterando o protocolo foram executadas, mas não obtivemos sucesso. As amostras foram então sequenciadas a partir do produto amplificado de 141 pb utilizando os primers do *Real-time* e obtivemos sucesso no sequenciamento de 17 amostras.

As sequências foram alinhadas e comparadas com outras no banco de dados (**Figura 39**). O alinhamento parcial confirmou a presença RNA viral dos Hantavirus, onde foi possível realizar uma análise parcial do segmento S (**Figura 40**). Em análise comparativa com outras sequências depositadas no *GenBank*, as amostras formaram dois *clusters* bem definidos, revelando uma porcentagem de similaridade entre 97% a 100% com o JUQV e entre 93% a 98% com o ARAV (**Tabela 13**).

	10	20	30	40	50	60	70
RichMore	GTGACGTA	ACAGAGGC	ATTACATAC	AGAGGGGAG	CTGTGTCTAC	ATTGGAGAC	AAACCTGGAG
ControlePositivo							
IngueteNegra			C.....G		G	T	A
Anajatuba			G			T	T
CastelochesBonhos			G	GGT		CT	G
Araraquara	A		GGT	G	A	CA	GG
Juquitiba			G			CT	GG
32H			G			CT	GG
46H			G			CT	GG
169H			GGT	G	A	G	CA
213H			GGT	G	A	CA	GG
256H			GGT	G	A	CA	GG
268H			G			CT	GG
274H			GGT	G	A	CA	GG
292H			G			CT	GG
305H			GGT	G	A	CA	GG
389H			G		G	CT	GG
395H			GGT	G	A	CA	GG
417H			GGT	G	A	CA	GG
420H			GGT	G	A	C.....CA	T.G
452H			G			CT	GG
461H			GGT	G	A	CA	GG
462H			GGT	G	A	G..G..CA	GG
511H			G			CT	GG
	110	120	130	140			
RichMore	GCCTCATA	GCTGGCTCA	AAACCGTTG	ATCCATCGG	G		
ControlePositivo							
IngueteNegra		AT.....G					
Anajatuba		A.....					
CastelochesBonhos		A.....A					
Araraquara	G.....G	AT.....					
Juquitiba	G	A.....A					
32H	G	A.....A					
46H	G	A.....A					
169H	G.....G	G A					
213H	G.....G	A					
256H	G.....G	A					
268H	G	A.....A					
274H	G.....G	A					
292H	G	A.....A					
305H	G.....G	A					
389H	G	A.....A					
395H	G.....G	A					
417H	G.....G	A					
420H	G.....G	A					
452H	G	A.....A					
461H	G.....G	A					
462H	G.....G	A					
511H	G	A.....A					

Figura 39 - Alinhamento da sequência de nucleotídeos parcial do segmento S de 141 pb detectadas em de soros de pacientes do Estado de Minas Gerais com outras sequências depositadas no GenBank. O alinhamento foi realizado pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 6.0.7.

Figura 40 - Dendrograma construído a partir da sequência parcial do segmento S (141- nt) dos hantavirus examinados neste estudo (soros de pacientes do Estado de Minas Gerais) e outros isolados relacionados. A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa PAUP 4.0b10, algoritmo *Neighbor- Joining* com parâmetro HKY indicado pelo *modelTest*. O *Bootstrap* >50 % foi obtido em análise de 1000 réplicas, e estão apresentadas nos pontos de ramificação. As sequências incluídas na análise foram (numero de acesso no *GenBank*): Anajatuba (DQ451829), Laguna Negra (AF005727), HTN-007 (AF133254), ARAV (EF571895), JUQV (EF492472), CASV (AF307324). Em azul estão representadas as amostras associadas ao JUQV e em vermelho as amostras associadas ao ARAV.

Tabela 13 - Comparação da similaridade (%) entre nucleotídeos (acima da diagonal) a divergência (abaixo da diagonal) de 141-nt da região da ORF (*Open Read Frame*) do segmento S dos hantavirus detectados em soro de pacientes de diferentes localidades do Estado de Minas Gerais com outras do *GenBank*.

Percent Identity																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
Divergence	1		95.8	88.7	91.5	91.5	92.3	100.0	90.8	90.8	91.5	88.0	89.4	90.1	88.0	89.4	88.7	90.1	90.1	90.8	90.1	91.5	89.4	89.4	88.0	1	Rio Mamore HTN007
	2	4.4		89.4	94.4	93.0	93.7	95.8	92.3	92.3	93.0	88.7	90.1	90.8	90.1	89.4	91.5	90.8	92.3	90.8	93.0	90.1	90.1	88.7	2	Anajatuba	
	3	12.4	11.5		90.1	89.4	88.7	88.7	90.1	90.1	89.4	96.5	97.9	88.7	93.7	97.9	97.2	89.4	98.6	90.1	98.6	89.4	97.9	97.9	95.1	3	Araraquara
	4	9.0	5.9	10.6		94.4	90.8	91.5	94.4	94.4	94.4	89.4	90.8	93.0	90.1	90.8	90.1	93.7	91.5	94.4	91.5	94.4	90.8	90.8	88.7	4	Castelo dos Sonhos
	5	9.0	7.4	11.5	5.9		91.5	91.5	99.3	99.3	100.0	88.7	90.1	97.9	90.1	90.1	89.4	98.6	90.8	99.3	90.8	100.0	90.1	90.1	91.5	5	Juquitiba
	6	8.4	6.7	12.3	9.9	9.1		92.3	92.3	92.3	91.5	86.6	88.0	90.8	86.6	88.0	87.3	91.5	88.7	92.3	88.7	91.5	88.0	88.0	86.6	6	Laguna Negra
	7	0.0	4.4	12.4	9.0	9.0	8.4		90.8	90.8	91.5	88.0	89.4	90.1	88.0	89.4	88.7	90.1	90.1	90.8	90.1	91.5	89.4	89.4	88.0	7	C+
	8	9.9	8.2	10.7	5.9	0.7	8.3	9.9		100.0	99.3	89.4	90.8	98.6	89.4	90.8	90.1	99.3	91.5	100.0	91.5	99.3	90.8	90.8	90.8	8	32H
	9	9.9	8.2	10.7	5.9	0.7	8.3	9.9	0.0		99.3	89.4	90.8	98.6	89.4	90.8	90.1	99.3	91.5	100.0	91.5	99.3	90.8	90.8	90.8	9	46H
	10	9.0	7.4	11.5	5.9	0.0	9.1	9.0	0.7	0.7		88.7	90.1	97.9	90.1	90.1	89.4	98.6	90.8	99.3	90.8	100.0	90.1	90.1	91.5	10	511H
	11	13.2	12.3	3.6	11.5	12.4	15.0	13.2	11.5	11.5	12.4		98.6	88.0	93.0	98.6	97.9	88.7	97.9	89.4	97.9	88.7	98.6	98.6	97.2	11	462H
	12	11.6	10.7	2.1	9.8	10.7	13.2	11.6	9.9	9.9	10.7	1.4		89.4	94.4	100.0	99.3	90.1	99.3	90.8	99.3	90.1	100.0	100.0	97.2	12	461H
	13	10.7	9.8	12.3	7.4	2.1	9.9	10.7	1.4	1.4	2.1	13.2	11.5		88.0	89.4	88.7	97.9	90.1	98.6	90.1	97.9	89.4	89.4	89.4	13	452H
	14	13.3	10.7	6.7	10.7	10.7	15.0	13.3	11.6	11.6	10.7	7.5	6.0	13.2		94.4	93.7	88.7	95.1	89.4	95.1	90.1	94.4	94.4	94.4	14	420H
	15	11.6	10.7	2.1	9.8	10.7	13.2	11.6	9.9	9.9	10.7	1.4	0.0	11.5	6.0		99.3	90.1	99.3	90.8	99.3	90.1	100.0	100.0	97.2	15	417H
	16	12.4	11.5	2.9	10.6	11.5	14.1	12.4	10.7	10.7	11.5	2.1	0.7	12.3	6.7	0.7		89.4	98.6	90.1	98.6	89.4	99.3	99.3	96.5	16	395H
	17	10.7	9.0	11.5	6.6	1.4	9.0	10.7	0.7	0.7	1.4	12.3	10.7	2.1	12.4	10.7	11.5		90.8	99.3	90.8	98.6	90.1	90.1	90.1	17	389H
	18	10.7	9.8	1.4	9.0	9.9	12.4	10.7	9.0	9.0	9.9	2.1	0.7	10.7	5.2	0.7	1.4	9.8		91.5	100.0	90.8	99.3	99.3	96.5	18	305H
	19	9.9	8.2	10.7	5.9	0.7	8.3	9.9	0.0	0.0	0.7	11.5	9.9	1.4	11.6	9.9	10.7	0.7	9.0		91.5	99.3	90.8	90.8	90.8	19	292H
	20	10.7	9.8	1.4	9.0	9.9	12.4	10.7	9.0	9.0	9.9	2.1	0.7	10.7	5.2	0.7	1.4	9.8	0.0	9.0		90.8	99.3	99.3	96.5	20	274H
	21	9.0	7.4	11.5	5.9	0.0	9.1	9.0	0.7	0.7	0.0	12.4	10.7	2.1	10.7	10.7	11.5	1.4	9.9	0.7	9.9		90.1	90.1	91.5	21	268H
	22	11.6	10.7	2.1	9.8	10.7	13.2	11.6	9.9	9.9	10.7	1.4	0.0	11.5	6.0	0.0	0.7	10.7	0.7	9.9	0.7	10.7		100.0	97.2	22	256H
	23	11.6	10.7	2.1	9.8	10.7	13.2	11.6	9.9	9.9	10.7	1.4	0.0	11.5	6.0	0.0	0.7	10.7	0.7	9.9	0.7	10.7	0.0		97.2	23	213H
	24	13.3	12.4	5.2	12.4	9.0	15.0	13.3	9.9	9.9	9.0	2.9	2.9	11.5	6.0	2.9	3.6	10.7	3.7	9.9	3.7	9.0	2.9	2.9		24	169H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			

5 DISCUSSÃO

5.1 Padronização da técnica de Real-time RT- PCR

O principal motivo pela escolha do método de detecção baseado no sistema *SYBR Green* é que os vírus de RNA apresentam um desafio no diagnóstico. Durante sua evolução, acumulam mutações que podem torná- los indetectáveis. Ao utilizar sondas *TaqMan* por exemplo, que possui extrema especificidade, existe a chance de se obter resultados falso- negativo, pois onde houver mutações no sítio de ligação da sonda, o vírus não será detectado (Papin et al., 2004).

A concentração ideal para reação foi inicialmente determinada variando a concentração dos *primers* (1,0 - 20 pmol), em experimentos separados, usando a mesma concentração de cDNA (3,0 ng/μL) obtido a partir da extração de RNA de cultura celular. Analisando a curva de amplificação, a concentração de 5,0 pmol não obteve o *Ct* mais alto, porém, a parte mais íngreme da curva manteve-se semelhante à de outras concentrações mais elevadas (Nanda et al., 2007), o que não interferiu na detecção dos produtos (**Figura 17**). Altas concentrações de oligonucleotídeos normalmente resultam em "*primer- dimers*". Quando analisada a curva de dissociação, foi possível selecionar a maior concentração de *primers* que não apresentaram formação de dímeros (**Figura 18**).

A aplicação da curva de dissociação tem o objetivo de verificar a ocorrência de *primer- dimers* ou produtos inespecíficos durante a reação, sendo possível diferenciar o DNA alvo de produtos indesejáveis. Quando há uma dissociação de uma população de moléculas com a mesma composição e do mesmo tamanho, é possível observar um pico no gráfico da quantidade de fluorescência emitida (Aitichou et al., 2005; Pryor et al., 2006) (**Figura 19**).

A técnica de *RT- Real- time PCR* baseado no sistema *SYBR Green* é amplamente utilizada no mundo todo, e uma de suas principais vantagens é reduzir problemas relacionados à contaminação evitando a abertura dos tubos de pós- amplificação no laboratório de pesquisa (Ririe et al., 1997; Dhar et al., 2001; Aitichou et al., 2005; Pryor e Wittwer, 2006; Jakab et al., 2007).

Os *primers* desenvolvidos "*in house*" apresentaram alta sensibilidade e são capazes de detectar os principais hantavírus brasileiros. O método de extração utilizado em urina, rins, pulmões e soro não apresentam limitações em termos de

detecção do RNA viral. A limitação do método utilizado está principalmente relacionada com a amplificação de produtos indesejáveis, já que o fluoróforo (*SYBR*) adere a qualquer cadeia de dupla fita de DNA presente na reação. No entanto, este problema foi resolvido logo após a conclusão da amplificação. Acompanhando a curva de dissociação (**Figura 19**), foi possível identificar os produtos indesejáveis com valores abaixo de T_m 78 °C, o que nos permitiu distinguir as amostras positivas de produtos inespecíficos (Ririe et al., 1997; Dhar et al., 2001). Os valores de T_m observados na amplificação do segmento S, não demonstraram alterações quando o mesmo equipamento foi utilizado para todas as amostras. As amostras foram consideradas positivas em diferentes equipamentos quando apresentado uma temperatura de *melting* de aproximadamente 82,1 °C (*ABI 7300- Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) e 83,1 °C (*Smart Cycle II-Cepheid*, Manitoba City, CA), com uma diferença de apenas 1 °C (**Figuras 20 e 21**). Esta diferença está provavelmente relacionada ao sistema de monitoramento nos dois equipamentos. O *ABI7300* tem a possibilidade de realizar testes em 96 amostras ao mesmo tempo em microplacas, já o *Smart Cycle II* possui sensores independentes que pode promover diferentes protocolos, no entanto, só analisa 16 amostras por corrida. A vantagem é que este modelo de equipamento é portátil e relativamente pequeno, podendo ser utilizado no campo (Schneider et al., 2004; Thomazelli et al., 2010).

Na padronização do teste, após a amplificação dos produtos por *Real-time RT-PCR*, as amostras foram aplicadas em gel de agarose, para visualização dos fragmentos de 141 pb e confirmação dos resultados (**Figura 22**). Esta análise foi essencial na quantificação e comparação da intensidade da banda observada com o pico obtido na curva de dissociação.

A quantificação relativa foi obtida a partir da construção da Curva Padrão utilizando RNA obtido de cultura celular e foi utilizada na comparação das amostras detectadas (Lyamichev et al., 1993). Em nossa análise conseguimos observar uma sensibilidade de detecção de até 1: 10.000.000 (0,0000003 ng de cDNA) (**Figura 24**). A curva manteve-se dentro da faixa de linearidade para todos os casos, apresentando um coeficiente de correlação superior a 0,99 (**Figura 25**). Para uma quantificação absoluta, o interessante seria utilizar um plasmídeo contendo a porção do gene S para determinar a quantidade em número de cópias das amostras positivas encontradas (Anwar et al., 2006; Pettersson et al., 2008). Entretanto, o

objetivo principal do trabalho foi realizar a detecção e a caracterização dos vírus encontrados.

Primers desenhados para o teste demonstrou alta especificidade quando testado com amostras de outros patógenos (**Figuras 26 e 27**) (Poersch, 2007). Não houve sinal de amplificação e também não foi observado picos quando analisado a curva de dissociação. Assim, demonstrando sua alta especificidade na detecção apenas dos hantavirus.

O método pode ser usado na detecção eficiente e demonstrou alta sensibilidade em casos de baixas concentrações de virais. O *PCR* em tempo real é atualmente considerado o "*gold standard*" para a detecção rápida de agentes patogênicos (Papin et al., 2004; Kramski et al., 2007).

Através da metodologia utilizada obtivemos resultados em menos de uma hora, representando um avanço significativo em comparação com métodos tradicionais. Outro fator é a sensibilidade do teste, Dhar e colaboradores (2001) utilizando o sistema *SYBR Green* obtiveram resultados interessantes até 2.000 vezes mais sensível que a *PCR* convencional, quando analisado o DNA genômico viral (Dhar et al., 2001).

Amostras que apresentaram intensidade de fluorescência relativa também chamada de "derivada" com índices abaixo de 0,8 não foram amplificadas quando utilizados outros primers. Neste caso a maioria das amostras com intensidade menor que 0,10 não foi possível obter produtos amplificados, apesar de diversas tentativas com mudança de reagentes, equipamentos e diferentes protocolos. Resultados semelhantes foram encontrados em amostras de baixas concentrações, não visualizadas em gel, mesmo quando detectadas por *Real-time PCR* (Dhar et al., 2001).

O uso dos testes moleculares para diagnósticos no Brasil poderá auxiliar laboratórios de pesquisa, além de diminuir a sobrecarga de trabalho para laboratórios de saúde pública pela versatilidade, rapidez e precisão.

5.2 Parque Estadual de Jacupiranga

O município de Jacupiranga foi eleito como primeiro ponto pela peculiaridade do local, próximo aos locais da reserva do Parque Nacional do Vale do Ribeira, que vem sofrendo uma redução gradativa da mata nativa e sendo substituída pela vasta plantação de banana. Os bananicultores estão constantemente entrando em contato com esses animais, por esse fato, o local despertou grande interesse científico e justificou-se ser um ponto importante para nossa coleta. O interessante é que estes animais foram capturados próximos às residências dos bananicultores. Alguns foram capturados no paiol onde havia alimentos para o consumo das famílias. Além do trabalho de captura, e de esclarecimento da pesquisa aos moradores locais, foi realizada a colheita de sangue de pessoas que anteriormente haviam apresentado resultados positivos em testes sorológicos para hantavirose. Este estudo paralelo foi realizado em conjunto a outro projeto científico de interesse em nosso laboratório intitulado “Soroprevalência para Hantavírus em amostras humanas na região tropical e subtropical do Brasil”. Nesta região, a intenção era de detectar a presença do vírus em animais reservatórios próximos a essas residências. No entanto, apesar de um prévio levantamento sorológico apontando resultados positivos para estes roedores, não encontramos nenhum resultado positivo nesta região (**Tabela 3**). O mesmo teste foi aplicado em soros humanos com resultados sorológicos positivos, entretanto, em nenhuma das amostras foi detectada a presença do RNA viral também. Os resultados negativos não surpreenderam, pois o nosso “N” amostral foi muito reduzido nesta região. As condições climáticas adversas imprevisíveis no período da coleta, com baixíssima temperatura pode ter colaborado para o pequeno número de roedores capturados.

Surgiu então a oportunidade de colaboração com outros projetos associados à captura de roedores, em diferentes locais do Estado de São Paulo. Estes novos sítios foram então acrescentados em nosso estudo.

5.3 Parque Estadual do Morro do Diabo

Em colaboração com o Instituto de Pesquisas Ecológicas, foram realizadas expedições ao município de Teodoro Sampaio, durante o ano de 2008 e 2009. Cidade localizada a 670 Km da cidade de São Paulo, fazendo divisa com os estados

do Paraná e Mato Grosso do Sul. Lugar conhecido por Pontal do Paranapanema, representa uma região de Cerrado interessante para nosso estudo. A região é marcada por assentamentos do MST (Movimento Sem Terra), próximo a reserva do Parque Estadual do Morro Diabo. Os animais foram capturados nos corredores de reflorestamento, na região dos assentamentos e dentro de residências, em local próximo a plantações de cana-de-açúcar e em cultura de subsistência. Apesar do esforço amostral, tanto os animais silvestres, quanto os roedores domésticos, todos sem exceção, apresentaram resultados negativos pelo *Real-time RT-PCR* e também pelo *RT-PCR* convencional (**Tabelas 4 e 5**).

5.4 Biritiba Mirim e Salesópolis

Foi possível detectar a presença do RNA viral em 10 amostras de roedores silvestres nesta região, sendo: 4 *Oligoryzomys* sp., 1 *Oryzomys* sp., 1 *Akodon* sp., 2 *Akodon montensis*, 1 *Tapthomys nigrita* e 1 *Juliomys* sp. Das dez amostras positivas, nove possuíam sequências que demonstraram entre 88% a 95% de semelhança com o ARAV e apenas uma delas, o *O. nigripes* (23) demonstrou similaridade de 88,3% com o JUQV (**Tabela 10**). Todas as diferentes espécies de roedores estudadas (com exceção de *O. nigripes* 23) formaram um grupo único (*Cluster*) que foi associado ao ARAV (**Figura 33**). Com relação ao segmento do gene M, não foi possível concluir o sequenciamento de todas as amostras positivas. Porém, obtivemos cinco amostras (*O. nigripes* 23, *O. nigripes* 36, *O. nigripes* 62, *O. nigripes* 64 e *Thapthomys nigrita*) com sequencias parciais do segmento M de 324 pb. Quando analisado o dendrograma construído para o segmento M, foi observado que as amostras segregaram de forma semelhante e mantiveram o mesmo padrão quando comparada com a análise realizada no segmento S (**Figura 34**). Um clado com roedores formando um único grupo com o ARAV e apenas o *O. nigripes* 23 segregou para o clado com o JUQV. Isso poderia estar relacionado principalmente ao hospedeiro que foi encontrado, sendo que no Brasil cada tipo de hantavírus está associado a uma espécie de roedor silvestre (Pereira et al., 1999; Figueiredo et al., 2001). Em nosso conhecimento, este estudo fornece a primeira evidência que o vírus ARAV está circulando em diferentes espécies de roedores na região de Mata Atlântica. No entanto, isso pode estar associado a uma transmissão inter-espécies,

entre animais que habitam a mesma área, devido à forte relação patógeno-hospedeiro (Ramsdem et al., 2009).

Estudos indicaram que o *Necromys lasiurus* é o reservatório natural do ARAV e que *O. nigripes* é o reservatório do JUQV (Suzuki et al., 2004; Souza et al., 2008). Apesar dessas evidências, acreditamos que nossos resultados podem ser relevantes, pelo fato do grande número de roedores da espécie *Akodon* sp. terem sido capturados na região de floresta Atlântica. A distribuição do *Akodon* sp. segue padrão semelhante ao do *Oligoryzomys nigripes*, estendendo-se pela Mata Atlântica e Cerrado (Pereira, 2006), indicando que esta região também pode haver circulação do ARAV.

Recentemente, os pesquisadores detectaram a presença de ARAV pela primeira vez nos tecidos de *Akodon* sp. no oeste do Estado de São Paulo, uma região de vegetação de Cerrado localizado em uma zona de transição dentro da Mata Atlântica. No mesmo estudo, um roedor da espécie *N. lasiurus* capturados na região do planalto central de Minas Gerais foi relatado infectado com o JUQV. A explicação mais conservadora para este achado é que um hantavírus associado com *Necromys* spp./*Akodon* spp. originado na região sul da América do Sul deu origem a duas linhagens virais. Uma dessas linhagens foi associada com *Oligoryzomys* spp. próximo a Juquitiba, nas florestas tropicais no sudeste do Brasil, enquanto a outra linhagem do ARAV dominou a região do Cerrado brasileiro (Figueiredo et al., 2009). Contudo, em nosso trabalho deparamos com situações associadas a biomas, com resultados que diferem do casual. Acreditamos que o papel de diferentes espécies de roedores com potenciais reservatórios e fontes de infecção humana ainda necessita de um melhor entendimento.

Nesta região, deparamos com um grande número de amostras positivas (18%) que poderia estar relacionado ao grande impacto ambiental observado na região (**Tabela 7**). A taxa média encontrada em estudos antecedentes utilizando métodos tradicionais é cerca de 5% a 8% (Souza et al., 2008). Entretanto, utilizando o sistema *SYBR Green*, pesquisadores obtiveram uma porcentagem de 13,5% em amostras de roedores capturados na região Transdanubian, na Hungria (Jakab et al., 2007).

Em 2001, a região de Biritiba Mirim sofreu com uma degradação ambiental grave quando aproximadamente 11,4 quilômetros quadrados de Mata Atlântica foram desmatados, com capacidade de acumular 35 milhões de metros cúbicos de

água, drenando uma área de 75 quilômetros quadrados (Departamento de Águas e Energia Elétrica- DAAE). Esta área foi inundada devido à construção de uma barragem, e os animais selvagens que dependiam desse ambiente foram comprimidos em áreas menores. A alta taxa de infecção em roedores pode ser uma consequência das perturbações ambientais constantes do seu habitat ou mesmo a brusca mudança climática (Clement et al., 2009), sendo que ambos poderiam ter alterado a densidade populacional de roedores e contribuiu para a taxa de disseminação do vírus. Os hantavírus são considerados altamente espécie-específicos, e a ocorrência de "*spillovers*" entre os roedores são raras, a não ser, em circunstâncias muito incomuns (Kuenzi et al., 2007).

A invasão dos habitats florestais proporciona aos seres humanos um contato cada vez mais estreito com populações de roedores que servem como reservatórios para o vírus desconhecidos, gerando sérios riscos à saúde pública. Estudos recentes têm mostrado que as áreas que sofrem graves alterações antrópicas têm as maiores taxas de infecção humana letal pelo ARAV, que é atualmente considerado o mais virulento dos hantavírus no Brasil (Figueiredo et al., 2009).

Este impacto ambiental favorece cada vez mais o risco do surgimento de vírus emergentes e re- emergentes como no caso dos hantavirus. O contato de animais silvestres com a população está aumentando, o que agrava ainda mais o quadro já preocupante. A região de Biritiba Mirim faz parte do cinturão verde do estado de São Paulo, responsável pela maior produção de verduras e hortaliças para o abastecimento da cidade. Acreditamos que o reflexo do desmatamento causado no local, onde foi destinada a construção da barragem, veio com o relato do Instituto Adolfo Lutz de um caso ocorrido com um agricultor da região, que veio a falecer em maio de 2003 de Hantavirose (Ministério Público Federal- MPF e Ministério Público Estadual- MPE, 2003). Esse fato foi o que motivou nosso trabalho e o grande interesse em investigar animais que possam ser reservatórios desses vírus na região.

5.5 Nazaré Paulista

A cidade de Nazaré Paulista localizada a 65 km de São Paulo é um local interessante para este tipo de estudo, pois possui muitos sítios e locais onde os agricultores estão diretamente em contato com o habitat natural destes animais. A

serra da Cantareira ainda preserva um dos poucos espaços de reserva de Mata Atlântica que resta no estado de São Paulo. Os roedores foram capturados numa área onde os moradores ocupam um local ainda muito próximo das matas de reserva. Normalmente observamos que o sucesso de captura é em torno de 5%, e neste ponto a taxa foi de 40%. Nessa amostragem, obtivemos resultados interessantes, pois detectamos a presença do RNA viral em quatro roedores representando 25% da amostragem (**Tabela 8**). O número elevado de animais capturados em apenas um dia e com poucas armadilhas, parece ser um indício da grande quantidade de roedores circulando nas proximidades das residências.

O teste apresentou sensibilidade na detecção nos rins e na urina destes animais, porém não obtivemos amplificação utilizando outros primers descritos. Diversas tentativas de amplificação foram realizadas, alterando protocolo e reagentes, mas não apresentaram amplificação. Possivelmente pelo fato da quantidade de vírus encontrado ser muito baixa, não obtivemos sucesso. No entanto, foi possível determinar qual o tipo viral o roedor da espécie *Oligoryzomys nigripes* (número 10) estava portando. A comparação nucleotídica demonstrou uma semelhança de 99% com o JUQV (**Tabela 13**). O dendrograma construído a partir do segmento S de 141 pb, apresentou uma associação com o JUQV (**Figura 38**). O resultado encontrado está de acordo com a relação patógeno- hospedeiro, descritos anteriormente, onde o JUQV está intimamente associado ao *Oligoryzomys* spp. (Suzuki et al., 2004; Figueiredo et al., 2009; Oliveira et al., 2009).

Estes dados são de extrema importância, pois a captura foi realizada muito próxima a sítios e residências, o que evidencia a proximidade destes animais, favorecendo a possibilidade de transmissão viral. O teste molecular pode ser importante no monitoramento destas áreas, para que medidas de controle sejam tomadas, já que nesta região é o primeiro relato da detecção em roedores portando hantavirus. Em relação, às outras 3 amostras positivas da espécie *Akodon cursor* ainda não foi possível concluir sua caracterização. Devido à baixa concentração viral encontrada, não foi possível obter sequências em condições de análise.

5.6 Detecção em soro humano

Do total de 27 soros de pacientes, enviados ao nosso laboratório, com sorodiagnóstico prévio para suspeita de hantavirose, nós realizamos a confirmação em 22 amostras, sendo foi possível detectar a presença do RNA viral por *Real-time RT-PCR* (**Tabela 9**). Em análise do alinhamento das sequências o JUQV foi associado como causador da doença no soro de 7 pacientes e os outros 10 foram associados ao ARAV. O dendrograma construído apresentou dois grupos bem definidos, sendo das 7 amostras: 1 de São Sebastião do Paraíso, 1 de Passos, 3 de Patrocínio e 2 de Uberaba, segregaram para o clado do JUQV. Enquanto as outras 10: 1 de Passos, 1 de Teófilo Otoni, 2 de Uberlândia, 2 de Uberaba, 1 de Patos de Minas, 1 de São Tomás de Aquino, 1 de Piumhi e 1 de Sete Lagoas formaram um único grupo associado ao ARAV (**Figura 40**).

Recentemente pesquisadores realizaram um levantamento sorológico em 400 moradores na zona rural e Peri urbana em Uberlândia, local onde encontraram 3% de positividade na população estudada (Limongi et al., 2009). Minas Gerais é o Estado com o maior número de casos do Brasil, e a ocorrência de hantavirose vem aumento ao longo dos anos, e por conta disto, o monitoramento deve ser realizado periodicamente nestas regiões. Desde 1998, quando foi relatado o primeiro caso em Minas até agosto de 2010 já somaram 236 casos (**Tabela 1**) (Silva-Vergara et al., 2002; SVS, 2010).

Amostras analisadas oriundas do município de Patrocínio (amostra 46, 452 e 511), colhidas de pacientes sintomáticos em diferentes períodos, parecem estar associadas ao vírus Juquitiba. Em trabalho realizado na caracterização de vírus encontrado em roedores silvestres na região do planalto central, um *Necromys lasiurus* capturado em São Gotardo- MG, cidade localizada a 120 km de Patrocínio, estes roedores estavam infectados com o JUQV (Figueiredo et al., 2009), dando indícios que este vírus poderia estar circulando em seu reservatório natural naquela região há muito mais tempo. Do total, três pacientes lamentavelmente foram a óbito, o que poderia ter sido evitado, com um diagnóstico rápido havendo tempo hábil para tratá- los. De acordo com Galeno (2002), o RNA do vírus Andes foi detectado por *RT-PCR* convencional no soro de um paciente assintomático, que morreu mais tarde devido a uma infecção por hantavírus, embora não tenham sido detectados

anticorpos antes de sua morte (Galeno et al., 2002). O teste apresentou sensibilidade na detecção em soro de pacientes com hantavirose. Pesquisadores obtiveram resultados semelhantes, utilizando o sistema *SYBR Green*, confirmando os resultados sorológicos, ao analisar amostras de um paciente infectado com Dobrava hantavirus (DOBV) (Jakab et al., 2007b).

Para avaliar a consistência dos resultados obtidos, analisamos o alinhamento do segmento S de 141 pb, dos 5 hantavirus encontrados no Brasil, e observamos que existem 27 mutações pontuais entre elas, o que representa 19% do fragmento em questão. Sendo assim, a região possui uma porcentagem divergente entre 4,4% a 12,4% entre os isolados (**Tabela 13**). Evidentemente que para um melhor entendimento filogenético, é necessária uma análise detalhada dos genes S e M dos vírus encontrados. Entretanto, mesmo se tratando de sequências relativamente curtas, acreditamos que esta pode ser utilizada na identificação dos genótipos, não afetando significativamente os valores genéticos de distâncias, sendo possível definir a que grupo pertence às amostras estudadas.

5.7 Inovações

O teste *One Step Real-time RT-PCR* em campo poderá ser aplicado no próprio local de captura e coleta de material biológico. A detecção molecular poderá ser executada em lugares remotos, de difícil acesso ou com capacidades limitadas, como por exemplo, armazenamento adequado da amostra ou ausência de energia elétrica (Takekawa et al., 2010; Thomazelli et al., 2010). Futuramente poderá ser utilizado para detectar a presença do RNA viral “*in locu*” em qualquer lugar do país. A reação possui alta sensibilidade, é simples e rápida, além disso, os resultados podem ser visualizados em apenas uma hora. Apesar de que, nesta ocasião não ter sido detectada amostras positivas nos roedores, os controles foram detectados perfeitamente, mantendo o mesmo padrão no trabalho comumente observado nos testes de rotina. O teste de campo poderá futuramente ser reproduzido em qualquer lugar do país, inclusive em casos de surtos ou no monitoramento de outras viroses emergentes ou no Brasil.

5.8 Considerações finais

No total foram analisadas 153 amostras sendo: 126 roedores silvestres e domésticos, de cinco regiões diferentes do Estado de São Paulo onde: 10 amostras oriundas do município de Jacupiranga, 61 colhidas em Teodoro Sampaio, 7 de Salesópolis, 48 amostras provenientes de Biritiba Mirim, 16 de Nazaré Paulista e por fim 27 soros de pacientes do Estado de Minas Gerais.

Detectamos ao todo 10 amostras positivas (18%) em Biritiba Mirim, 4 (25%) em Nazaré Paulista e 22 soros (81%) de pacientes com hantavirose. Destas, foi possível analisar sequências de 28 amostras com sucesso, sendo: 10 amostras de Biritiba Mirim, analisados os segmentos parciais S e M; 1 amostra de Nazaré Paulista, analisado o segmento S de 141pb e por fim, 17 amostras de soros humanos, analisado também o segmento parcial do gene S.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram utilizados métodos moleculares utilizando primers específicos desenvolvidos para detectar as principais hantavirose no Brasil. Além de sua rapidez, possui alta sensibilidade e especificidade para detectar baixas concentrações de vírus. O teste foi capaz de detectar a presença de ambos os vírus ARAV e JUQV que são de importância zoonótica no Brasil.

O monitoramento contínuo através de testes moleculares em animais silvestres é imprescindível para um melhor entendimento da circulação dos hantavirus nessas regiões. Acreditamos que este teste possa auxiliar laboratórios de saúde pública na vigilância e no diagnóstico dos hantavirus no Brasil.

O teste apresentou sensibilidade na detecção do vírus em soros de pacientes com hantaviose, para os dois principais vírus circulantes no Brasil, o ARAV e o JUQV. Estes dados indicam que os dois principais hantavirus do Brasil podem estar circulando no Estado de Minas Gerais. Futuramente a técnica poderá ser utilizada no diagnóstico rápido em pacientes com suspeita de infecção por hantavirus.

Hoje nossa equipe de campo e de laboratório apresenta capacidade de realizar coleta de amostras nos sítios de interesse, bem como promover a detecção e caracterização desses novos vírus. O laboratório BSL3⁺ do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo demonstra que sua estrutura nos permite trabalhar em segurança na análise e caracterização de vírus perigosos, como no caso dos hantavirus.

REFERÊNCIAS

Aitichou M, Saleh SS, Mcelroy AK, Schmaljohn C, Ibrahim MS. Identification of Dobrava, Hantaan, Seoul, and Puumala viruses by one-step real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. 2005;124:21–6.

Anwar A, August JT, Too HP. A stem-loop-mediated reverse transcription real-time PCR for the selective detection and quantification of the replicative strand of an RNA virus. *Anal Biochem*. 2006;352(1):120-8.

Borges AA, Campos GM, Moreli ML, Souza RL, Aquino VH, Saggiaro FP, Figueiredo LT. Hantavirus cardiopulmonary syndrome: immune response and pathogenesis. *Microbes Infect*. 2006;8(8):2324-30.

Castro-Arellano I, Suzán G, León RF, Jiménez RM, Lacher TE Jr. Survey for antibody to hantaviruses in Tamaulipas, Mexico. *J Wildl Dis*. 2009 Jan;45(1):207-12.

Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of hantavirus infection – Southwestern United States 1993. *MMWR* 1993;42:477–9.

Center for Control Diseases and Prevention (CDC). Laboratory Management of Agents Associated with Hantavirus Pulmonary Syndrome: Interim Biosafety Guidelines, *MMWR* 43(RR-7): 1-7. Atlanta:CDC;1994. [Homepage on the Internet] Available from: <http://www.cdc.gov.br/od/ohs/biosfty/hantavir.html>. [2006 out 07].

Center for Control Diseases and Prevention (CDC). Special Pathogens Branch, Division of Viral and Rickettsial Diseases. National Center for Infectious Diseases. Department of Health and Human Services. All about Hantavirus. Atlanta:CDC;1999. [Homepage on the Internet]. Available from:<http://www.ede.gov/ncidod/diseases/hanta/hps>. [2006 fev 23].

Chapman LE, Ellis BA, Koster FT, Sotir M, Ksiazek TG, Mertz GJ, Rolin PE, Baum KF, Pavia AT, Christenson JC, Rubin PJ, Jolson HM, Behrman RE, Khan AJ, Wilson Bell LJ, Simpson GL, Hawk J, Holman RC, Peters CJ; 150 Ribavirin Study Group.

Discriminators between Hantavirus – Infected and Uninfected Persons Enrolled in a Trial of Intravenous Ribavirin for Presumptive Hantavirus Pulmonary Syndrome. *Clin Infect Dis*. 2002;34(3):293-304.

Chizhikov VE, Spiropoulou CF, Morzunov SP, Monroe MC, Peters CJ, Nichol ST. Complete genetic characterization and analysis of isolation of Sin Nombre virus. *J Virol*. 1995;69(12):8132-6.

Clement J, Vercauteren J, Verstraeten WW, Ducoffre G, Barrios JM, Vandamme AM, Maes P, Van Ranst M. Relating increasing hantavirus incidences to the changing climate: the mast connection. *International Journal of Health Geographics*. 2009;8:1-11.

Cueto GR, Cavia R, Bellomo C, Padula PJ, Suárez OV. Prevalence of hantavirus infection in wild *Rattus norvegicus* and *R. rattus* populations of Buenos Aires City, Argentina. *Trop Med Int Health*. 2008 Jan;13(1):46-51.

Cubie, H. A, Seagar, A. L, Mcgoogan, E., Whitehead, J., Brass, A., Arends, M. J. & Whitley, M. W. Rapid real time PCR to distinguish between high risk human papillomavirus types 16 and 18. Regional Clinical Virology Laboratory, Lothian University Hospitals. *Mol Pathol*. 2001 Feb; 54(1):24-9.

Departamento de Águas e Energia Elétrica - DAAE. [página na Internet]. Disponível em: <http://www.daee.sp.gov.br/>. [2010 jun 20].

De Souza, Moreli ML, Borges AA, Campos GM, Livonesi MC, Figueiredo LT, Pinto AA. Natural host relationships and genetic diversity of rodent-associated hantaviruses in southeastern Brazil. *Intervirology*. 2008;51(4):299-310.

Delfraro A, Tomé L, D'Elía G, Clara M, Achával F, Russi JC, Rodonz JR. Juquitiba-like hantavirus from 2 nonrelated rodent species, Uruguay. *Emerg Infect Dis*. 2008 Sep;14(9):1447-51.

Dhar AK, Roux MM, Klimpel KRJ. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR Green chemistry. Clin Microbiol. 2001 Aug; 39(8):2835-45.

Easterbrook JD, Klein SL. Immunological Mechanisms Mediating Hantavirus Persistence in Rodent Reservoirs. PLoS Pathog. 2008;4(11):1-8.

Elkhoury MR, Wada MY, Carmo EH, Luna EJA, Elkhoury ANSM, Teixeira KG, Nunes ML, Barbosa NP. Aspectos Epidemiológicos da Infecção e da Patogenicidade por Hantavírus no Brasil; 2004. Boletim Eletrônico Epidemiológico - SVS. 2005;3:1-5.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution. 1985;39:783-91.

Ferreira, M. S. Hantavíroses. Artigo Revisão. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2003;36(1):81-96.

Ferres M, Vial P, Marco C, Yanez L, Godoy P, Castillo C, et al. Prospective evaluation of household contacts of persons with hantavirus cardiopulmonary syndrome in Chile. J Infect Dis. 2007;195:1563–71.

Figueiredo LT M; Moreli ML; Almeida VSO; Felix PR; Bruno JC; Ferreira IB; e et al. Hantavirus pulmonary syndrome (HPS) in Guariba, SP, Brazil. Report of 2 cases. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1999;41:131-37.

Figueiredo LTM; Forster AC; Fulhorst C; Rodrigues EMS; Koster F; Campos GM. Contribuição ao diagnóstico, ao tratamento, à epidemiologia e ao controle da síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus. Informe Epidemiol SUS. 2000;9:167-78.

Figueiredo LMT, Campos GM, Rodrigues FB. Hantavirus pulmonary and cardiovascular syndrome: epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis

and management aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2001;34(1):13-23.

Figueiredo LT, Moreli ML, Borges AA, Figueiredo GG, Souza RL, Aquino VH. Expression of a hantavirus N protein and its efficacy as antigen in immune assays. *Braz J Med Biol Res*. 2008 Jul;41(7):596-9.

Figueiredo LT, Moreli ML, de-Souza RL, Borges AA, de-Figueiredo GG, Machado AM, Bisordi I, Nagasse-Sugahara, TK, Suzuki, A, Pereira, LE, de-Souza RP, de-Souza, LT, Braconi CT, Harsi CM, de-Andrade-Zanotto PM & Viral Diversity Genetic Network Consortium. Hantavirus pulmonary syndrome, central plateau, southeastern, and southern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009 Apr;15(4):561-7.

FIELDS BN; KNIPE DM; e HOWLEY PM. *Fields Virology*. 3th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. Vol. 1.

Fundação Nacional de Saúde - FUNASA. Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica em 2002 a 2010. [página na Internet]. Disponível em: www.funasa.gov.br. [2010 abr 22].

Galeno H, Mora J, Villagra E, Fernandez J, Hernandez J † Mertz GJ, Ramirez E. First Human Isolate of Hantavirus (*Andes virus*) in the Americas. *Emerging Infectious Diseases*. 2002;8(7):657-61.

Governo do Estado de São Paulo. Secretaria de Economia e Planejamento. Plano Cartográfico do Estado de São Paulo. [página na Internet]. Disponível em: <http://www.sp-turismo.com/mapas.htm>. [2010 out 01].

Green W, Feddersen R, 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*. 1998 Jun;177(6):1696-700.

Hall TA: BioEdit. a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95–98.

Hjelle B. Vaccines against hantaviruses. *Expert Rev Vaccines*. 2002 Oct;1(3):373-84. Review.

Henttonen H, Buchy P, Suputtamongkol Y, Jittapalapong S, Herbreteau V, Laakkonen J, Chaval Y, Galan M, Dobigny G, Charbonnel N, Michaux J, Cosson JF, Morand S, Hugot JP. Recent discoveries of new hantaviruses widen their range and question their origins. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Dec;1149:84-9.

Higuchi R; Dollinger G; Walsh PS e Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Roche Molecular Systems: Biotechnology*. 1992 Apr;10(4):413-7.

Higuchi R; Fockler C; Dollinger G e Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Roche Molecular Systems. Biotechnology* 1993 Sep;11(9):1026-30.

Hooper JW, Custer DM, Smith J, Wahl-Jensen V. Hantaan/Andes virus DNA vaccine elicits a broadly cross-reactive neutralizing antibody response in nonhuman primates. *Virology*. 2006 Mar;347(1):208-16.

Iversson L. Doença humana por hantavirus. In R Veronesi, R Focaccia (editors), *Tratado de Infectologia*, São Paulo. Atheneu. 1996;219-228.

Jakab F, Horváth G, Ferenczi E, Sebok J, Varecza Z, Szucs G. Detection of Dobrava hantaviruses in *Apodemus agrarius* mice in the Transdanubian region of Hungary. *Virus Res*. 2007 Sep;128(1-2):149-52.

Jakab F; Sebok J; Ferenczi E; Horváth G; Szucs G. First detection of Dobrava hantavirus from a patient with severe haemorrhagic fever with renal syndrome by SYBR Green-based real time RT-PCR. *Scand J Infect Dis*. 2007b;39(10):902-6.

Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, Peters CJ, Nichol ST. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology*. 1997 Nov;238(1):115-27.

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

Johnson KM. The discovery of hantaan virus: comparative biology and serendipity in a world at war. *J Infect Dis*. 2004 Nov;190(9):1708-10.

Katz G; Williams RJ; Burt MS; De Souza LT; Pereira LE; Mills JN; Suzuki A; Ferreira IB; Souza RP; Alves VA; Bravo JS; Yates TL; Meyer R; Shieh W; Ksiazek TG; Zaki SR; Khan AS; Peters CJ. Hantavirus pulmonary syndrome in the State of Sao Paulo, Brazil, 1993-1998. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2001 Fall;1(3):181-90.

Khaiboullina SF; Morzunov SPST; Jeor SC. Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis. *Current Molecular Medicine*. 2005;5:773-90.

Ksiazek TG, Peters CJ, Rollin PE, Zaki SR, Nichol S, Spiropoulou CF, Morzunov S, Feldman H, Sanchez A, Khan A, Mahy B, Wachsmuth K, Butler J: Identification of a new North American hantavirus that causes acute pulmonary insufficiency. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;52:1017-1023.

Kramski M, Meisel H, Klempa B, Krüger DH, Pauli G, Nitsche A. Detection and typing of human pathogenic hantaviruses by real-time reverse transcription-PCR and pyrosequencing. *Clin Chem*. 2007 Nov;53(11):1899-905.

Kruger DH; Ulrich R; Lundkvist AA. Hantavirus infections and their prevention. *Microbes. Infect*. 2001;3:1129-144.

Kuenzi AJ, Morrison ML, Madhav NK, Mills JN. Brush mouse (*Peromyscus boylii*) population dynamics and hantavirus infection during a warm, drought period in southern Arizona. *J Wildl Dis*. 2007 Oct;43(4):675-83.

Lázaro ME, Cantoni GE, Calanni LM, Resa AJ, Herrero ER, Iacono MA, et al. Clusters of hantavirus infection, southern Argentina,. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:104–10.

Lyamichev V, Brow MA, Dahlberg JE. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* 1993 May;260(5109):778–83.

Lee HW, Lee PW. Korean haemorrhagic fever. I. Demonstration of causative antigen and antibodies. *Kor J Intern Méd.* 1976;19:371-94.

Lee HW, Lee PW. Korean hemorrhagic fever. II. Isolation of etiologic agent. *J Kor J Virol.* 1977;7:19.

Lee HW; Lee PW and Johnson KM. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 1978;137:298–308.

Lee HW, Baek LJ, Johnson KM. Isolation of hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J Infect Dis.* 1982;146(5):638–44.

Limongi JE, da Costa FC, Pinto RM, de Oliveira RC, Bragagnolo C, Lemos ER, de Paula MB, Pajuaba Neto AA, Ferreira MS. Cross-sectional survey of hantavirus infection, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009 Dec;15(12):1981-3.

Lukhtanov EA, Lokhov SG, Gorn VV, Podyminogin MA, Mahoney W. Novel DNA probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence. *Nucleic Acids Res.* 2007;(35):1-14.

Maes P, Clement J, Van Ranst M. Recent approaches in hantavirus vaccine development. *Expert Rev Vaccines.* 2009 Jan;8(1):67-76. Review.

Maes P, Klempa B, Clement J, Matthijnssens J, Gajdusek DC, Krüger DH, Van Ranst M. A proposal for new criteria for the classification of hantaviruses, based on S and M segment protein sequences. *Infect Genet Evol.* 2009 Sep;9(5):813-20.

Martinez VP, Bellomo C, San Juan J, Pinna D, Forlenza R, Elder M, et al. Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1848–53.

McKee KT Jr, Kim GR, Green DE, Peters CJ. Hantaan virus infection in suckling mice: virologic and pathologic correlates. *J Med Virol.* 1985 Oct;17(2):107-17.

Mendes WS, Aragão NJL, Santos HJ, Raposo L, Vasconcelos PFC, Rosa EST, Elkhoury MR. Hantavirus Pulmonary Syndrome In Anajatuba, Maranhão, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 2001;43(4):237-40.

Medina RA, Torres-Perez F, Galeno H, Navarrete M, Vial PA, Palma RE, Ferres M, Cook JA, Hjelle B. Ecology, genetic diversity, and phylogeographic structure of andes virus in humans and rodents in Chile. *J Virol.* 2009 Mar;83(6):2446-59.

Mills JN. Regulation of rodent-borne viruses in the natural host: Implications for human disease, 2005. *Archives of Virology.* 2005;19:45–57.

Mills JN, Johnson JM, Ksiazek TG, Ellis BA, Rollin PE, Yates TI, Mann MO, Johnson MR, Campbell ML, Miyashiro J, Patrick M, Zyzak M, Lavender D, Novak MG, Schmidt K, Peters CJ, Childs JE. A survey of Hantavirus antibody in small mammal populations in selected U. S. national parks. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1998;58:525–532.

Ministério Público Estadual - MPE e Ministério Público Federal - MPF. MPF e MPE movem ação para interromper desmatamento causado por obra de represa (2003). [página na Internet]. Disponível em: http://www.prsp.mpf.gov.br/sala-de-imprensa/noticias_prsp/noticia-24. [2010 out. 05]

Morse SS. The public health threat of emerging viral disease. *J Nutr.* 1997 May;127(5 Suppl):951S-957S.

Moreli ML, De Sousa RLM, Figueiredo LTM. Detection of Brazilian Hantavirus by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Amplification of N Gene in Patients with Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004;99(6):633-8.

Nanda S, Jayan G, Voulgaropoulou F, Sierra-Honigmann AM, Uhlenhaut C, McWatters BJ, Patel A, Krause PR. Universal virus detection by degenerate-oligonucleotide primed polymerase chain reaction of purified viral nucleic acids. *Journal of Virological Methods.* 2008;152:18–24.

Nemirov K, Henttonen H, Vaheri A, Plyusnin A. Phylogenetic evidence for host switching in the evolution of hantaviruses carried by *Apodemus* mice. *Virus Res.* 2002 Dec;90(1-2):207-15.

Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Felmann H. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science.* 1994;262:832–6.

Nowak RM. *Walker's Mammals of the World.* 5th ed. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press; 1991.

Oliveira RC, Teixeira BR, Mello FC, Pereira AP, Duarte AS, Bonaldo MC, Bonvicino CR, D'Andrea PS, Lemos ER. Genetic characterization of a Juquitiba-like viral lineage in *Oligoryzomys nigripes* in Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop.* 2009 Nov;112(2):212-8.

Padula PJ, Rossi CM, Della Valle MO, Martinez PV, Colavecchia SB, Edelstein A, Miguel SD, Rabinovich RD, Segura, E.L. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. *J Med Microbiol.* 2000;49:149-55.

Padula PJ, Colavecchia SB, Martinez VP, Gonzalez Della Valle MO, Edelstein A, Miguel SD, et al. Genetic diversity, distribution, and serological features of

hantavirus infection in five countries in South America. J Clin Microbiol. 2000;38:3029–35.

Papin JF, Vahrson W, Dittmer DP. SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile Virus circumvents false-negative results due to strain variability. J Clin Microbiol. 2004 Apr;42(4):1511-8.

Pereira LE, Souza LTM, Souza RP, Bisordi I, Susuki A, Katz G. Histórico da vigilância eco- epidemiológica do hantavírus no Brasil. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Rev Coord Inst Pesq. 1999;(3)5-12.

Pereira LE. Estudo eco- epidemiológico de hantavírus em roedores das regiões da Mata Atlântica e Cerrado do Brasil. [tese (Doutorado em Ciências)] São Paulo: apresentada a Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2006.

Peters CJ, Simpson GL, Levy H. Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. Annu Rev Med.1999;50:531-545.

Pettersson L, Klingström J, Hardestam J, Lundkvist A, Ahlm C, and Evander M. Hantavirus RNA in Saliva from Patients with Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. Emerging Infectious Diseases. 2008;14,(3)406-11

Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. Curr Top Microbiol Immunol. 2001;V256:47-75.

Pryor RJ, Wittwer CT. Real- time polymerase chain reaction and melting curve analysis. Methods Mol Biol. 2006;336:19-32.

Poersch, C. O. Desenvolvimento e avaliação de detecção de métodos moleculares para o diagnóstico da Dengue [tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)] Curitiba: Instituto Oswaldo Cruz, 2007.

Raboni SM, Probst CM, Bordignon J, Zeferino A, Santos CN. Hantaviruses in central South America: phylogenetic analysis of the S segment from HCPS cases in Paraná, Brazil. *J Med Virol*. 2005;76:553–62.

Ramsden C, Melo FL, Figueiredo LM, Holmes EC, Zanotto PM, VGDN Consortium: Morelli ML, Sousa RLM, Borges AA, Figueiredo GG, Bisordi I, Nagasse-Sugahara TK, Suzuki A, Pereira LE, de Souza RP, de Souza LTM, Braconi CT, Araujo J. High rates of molecular evolution in hantaviruses. *Mol Biol Evol*. 2008;25:1488–92.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997 Feb;245 (2):154-60.

Romano-Lieber NS, Yee J, Hjelle B. Serologic survey for hantavírus infections among wild animals in rural areas of Sao Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2001;43:325-27.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd ed. New York; Cold Spring Harbor Press; 1989.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings National Academy of the Science*. 1997;74:5463-67.

Secretaria de Vigilância em Saúde- SVS. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica Casos de Hantavirose por Unidade Federada Provável de Infecção e Ano de Ocorrência. Brasil, 1993 - 2010 [página na Internet]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude/>. [2010 ago 20].

Schatzmayr, HG. Viroses emergentes e reemergentes. *Cad Saúde Pública*. 2001; 17(suplemento):209-13.

Schmaljohn CS, Schmaljohn AL, Dalrymple JM. Hantaan virus M RNA: coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. *Virology* 1987;157(1):31-39.

Schmaljohn CS. Bunyaviridae: The Virus and Their Replication. In: Fields Virology. 3th ed. Philadelphia: Raven Publishers; 1996 p. 1447-94.

Schmaljohn CS, Nichol ST. *Bunyaviridae*, In: Knipe DM, Howley PM, Griffi NDE, Lamb Ra, Martin Ma, editors. Fields virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 1741–89.

Schmaljohn C, Hjelle B. Hantavirus: a global disease problem. Emerging Infectious Diseases. 1997;3:95-104.

Schneider WL, Sherman DJ, Stone AL, Damsteegt VD, Frederick RD. Specific detection and quantification of Plum pox virus by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. Journal of Virological Methods. 2004;120:97–105.

Silva MV, Vasconcelos MJ, Hidalgo NTR, Veiga APR, Canzian M, Marotto PCF, Lima VCP. Hantavirus pulmonary syndrome: report of the first three cases in São Paulo, Brazil. Rev. do Instituto de Med. Trop., São Paulo. 1997;39:231-234.

Silva-Vergara ML, Júnior JCC, Barata CH, Curi VGM, Júnior CGT, Teixeira AC. Hantavirus Pulmonary Syndrome in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(6):783-87.

Souza RL de, Moreli ML, Borges AA, Campos GM, Livonesi MC, Figueiredo LT, Pinto AA. Natural host relationships and genetic diversity of rodent-associated hantaviruses in southeastern Brazil. Intervirology. 2008;51(4):299-310.

Song JW, Moon SS, Gu SH, Song KJ, Baek LJ, Kim HC, Kijek T, O'Guinn ML, Lee JS, Turell MJ, Klein TA. Hemorrhagic fever with renal syndrome in 4 US soldiers, South Korea, 2005. Emerg Infect Dis. 2009 Nov;15(11):1833-6.

Suzuki A, Bisordi I, Levis S, Garcia J, Pereira LE, Souza RP, Sugahara, TKN, Pini N, Enria D, Souza LT.M (2004). Identifying Rodent Hantavírus Reservoirs. Brazil, Emerging Infectious Diseases. 2004;10(12)2127-34.

Swofford DL. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 2002.

Takekawa JY, Iverson SA, Schultz AK, Hill NJ, Cardona CJ, Boyce WM, Dudley JP. Field detection of avian influenza virus in wild birds: evaluation of a portable rRT-PCR system and freeze-dried reagents. *J Virol Methods*. 2010 Jun;166(1-2):92-7.

Thomazelli LM, Araujo J, Oliveira DB, Sanfilippo L, Ferreira CS, Brentano L, Pelizari VH, Nakayama C, Duarte R, Hurtado R, Branco JO, Walker D, Durigon EL. Newcastle disease virus in penguins from King George Island on the Antarctic region. *Vet Microbiol*. 2010 May;1-6.

Toro J, Vega JD, Khan AS, Mills JN, Padula P, Terry W, et al. An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Chile, 1997. *Emerg Infect Dis*. 1998;4:687–94.

Vasconcelos MI, Lima VP, Iversson LB, Rosa MD, Da Rosa AP, Da Rosa ES, Pereira LE, Nassar E, Katz G, Matida LH, Zaparoli MA, Ferreira JJ, Peters CJ. Hantavirus pulmonary syndrome in the rural area of Juquitiba, Sao Paulo metropolitan area, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1997 Jul-Aug;39(4):237-8.

Vasconcelos PFC, Travassos Da Rosa, APA, Rodrigues SG, Travassos Da Rosa E S, Dégallier N, Travassos Da Rosa JFS. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of Arboviruses. *Cad Saúde Pública*. 2001;17(suppl.):155-64.

Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, Adami HO, Gyllensten UB, Melbye M. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. Department of Medical Epidemiology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. *Lancet*. 2000;355(9222):2194-8.

Weidmann M, Rudaz V, Nunes MR, Vasconcelos PF, Hufer FT. Rapid detection of Human Pathogenic Orthobunyaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003 July; 3299-3305.

Wells RM, Sosa Estani S, Yadon ZE, Enria E, Padula P, Pini N, et al. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? *Emerg Infect Dis.* 1997;3:171–4.

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 1997 Jan;22(1):130-1, 134-8.

Zaki SR, Greer PW, Coffield LM, Goldsmith CS, Nolte KB, Foucar K, Feddersen RM, Zumwalt RE, Miller GL, Khan AS. Hantavirus pulmonary syndrome: Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J of Pathol* 1995;146:552-79.

Zaki SR, Khan AS, Goodman RA, Armstrong LR, Greer PW, Coffield LM, Ksiazek, TG, Rollin PE, Peters CJ, Khabbaz RF. Retrospective diagnosis of Hantavirus Pulmonary Syndrome, 1978-1993. *Arch Pathol Lab Med.* 1996;120:134-39.

Zhao X, Hay J. The evolution of hantaviruses. *Immunol Invest*. 1997 Jan-Feb;26(1-2):191-7. Review.

Zou Y, Hu J, Wang ZX, Wang DM, Yu C, Zhou JZ, Zhang YZ. China: evidence for Guizhou as a radiation center of the present Hantaan virus. *J Gen Virol*. 2008;89(Pt 8):1987-97.

De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].