**Felipe Alves Morais**

# *Ocorrência de anticorpos anti-hantavírus (IgG) em populações humanas na região Amazônica e no estado de São Paulo (Mata Atlântica), utilizando proteína recombinante (nucleocapsídio) do vírus Araraquara*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia
Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon

São Paulo
2010

# RESUMO

Morais FA. **Ocorrência de anticorpos anti-hantavírus (IgG) em populações humanas na região Amazônica e do Sudeste Brasileiro (Mata Atlântica), utilizando proteína recombinante (nucleocapsídio) do vírus *Araraquara*.** [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A hantavirose (infecção por *Hantavírus*) é uma das zoonoses que vem preocupando as autoridades sanitárias de todo o mundo. Sua ocorrência se deve principalmente os distúrbios ecológicos é transmitida ao homem através de inalação de partículas virais contida na excreta de roedores. São conhecidas duas doenças humanas distintas causadas pelo *Hantavírus*: a Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) e a Síndrome Pulmonar e Cardiovascular (SPCVH). O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de anticorpos IgG anti-hantavírus, através do ELISA, em populações da Amazônia e Sudeste brasileiro, que vivem em contato com os roedores silvestres, utilizando a proteína recombinante do vírus *Araraquara* expressa em *Escherichia coli*,. Do total de estudados 1308 soros humanos estudados, na Amazônia (1078) encontramos 59 soros positivos (5%). Na cidade Machadinho do Oeste–RO os soros coletados durante o ano 2003, foram analisados 638, onde foram encontrados 20 soros positivos (4,5%); e no Rio Machado– RO. foram analisados 435 soros da população ribeirinha onde foram encontrados 39 (5%) soros positivos, respectivamente. Após análise realizada em 151 soros humanos provenientes do Vale do Ribeira, em 2007; e 84 no Pontal do Paranapanema, em 2008, foram observados 14 positivos (9%) e 6 (7%) das amostras, respectivamente.



**Palavras-chave:** Hantavírus. ELISA. Soroepidemiologia. Diagnóstico. Hantavirose. Antígeno recombinante brasileiro.

## ABSTRACT

Morais FA. **Detection of antibodies (IgG) against hantavirus in human population of Amazon region and Brazilian southwest (Rain Forest), using recombinant antigen of *Araraquara* virus.** [PhD Thesis (Biotechnology)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

The genus *Hantavirus* of the family Bunyaviridae includes a large number of rodent-borne viruses that are distributed worldwide. The occurrence is due mainly to ecological disturbances and it is transmitted to the humans through inhalation of virus particles contained in the excreta of wild rodents. Two different human diseases known to be caused by *Hantavirus*: are Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS) and Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome (HPS). The main objective of this study was detected antibody against hanatavirus (IgG) by ELISA, in Amazon region and Brazilian Southwest populations who live in contact with the wild rodents, using recombinant protein (antigen) of the *Araraquara* virus expressed in *Escherichia coli*. We study 1308 human sera (1078 from Amazon region) and there were found 59 (5%) positive sera. From the city of Machadinho do Oeste – RO (2003 year), 633 sera were analysed, where there were found to be 20 positive (4.5%) serums. In Machado river – RO (2005 year), 435 sera of the river-dwelling population were analysed where there were found 39 (5%) positive sera, respectively. After analysis was accomplished for 151 human sera coming from the Vale do Ribeira - SP, in 2007, and 84 from the Pontal do Paranapanema - SP, in 2008, 14 (9%) and 6 (7%) of the samples were observed to be positive, respectively.



**Keywords:** Hantavirus. ELISA. Serosurvey. Diagnostic. HPS/HFRS. Brazilian recombinant antigen.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Revisão da literatura

Os primeiros relatos de uma doença febril com fenômenos hemorrágicos, possivelmente associados a hantavírus, encontram-se na literatura chinesa desde o inicio do século X (Lee, 1989). O primeiro hantavírus descrito na literatura, foi isolado em 1975, por Lee et al., em tecidos de roedor silvestre Apodemus agrarius capturado às margens do rio Han, na Coréia do Sul (Lee, 1989; Lee et al., 1979). No mesmo ano, este autor relacionou os quadros clínicos de febre hemorrágica com síndrome renal que ocorriam na Coréia do Sul com o hantavírus (Lee, 1989).

No continente americano, a primeira observação sobre a existência de hantavírus ocorreu em 1984, no norte dos estados Unidos, quando se encontrou em um soro de roedor silvestre *Microtus pensilvanicuss* anticorpos contra hantavírus (Yanagihara *et al.,* 1985). Entretanto, somente em 1993 descreveu-se uma doença humana causada por estes vírus, durante uma epidemia de Síndrome Pulmonar e Cardiovascular (SPCVH) entre índios navajos do sudoeste dos EUA (Nichol et al*.,* 1993).

Estudos sorológicos dos roedores predominantes nesta região e de pessoas infectadas, possibilitaram constatar a existência de um novo *hantavírus*, o qual foi denominado de *Sin Nombre* (SNV) (Nichol et al., 1993). Após esta epidemia, um numero crescente de casos da SPCVH foram descritos na América do Norte, na América Central e na América do Sul (Machado, 2007).

No Brasil, o primeiro caso confirmado de SPCVH ocorreu em 1993, na cidade de Juquitiba, no estado de São Paulo. Sendo denominado de vírus *Juquitiba* (JUQV), tendo como referência a cidade onde ocorreu o primeiro caso (Johnson et al*.,* 1999; Monroe et al*.,* 1999). Em 1995 e 1996 foram diagnosticados novos casos de SPCVH no Brasil por testes sorológicos de ELISA. Um caso foi observado no vilarejo de Castelo dos Sonhos, estado de Mato Grosso. Este isolado de hantavírus, após análise filogenética, foi denominado de *Castelo dos Sonhos* (CASV) (Johnson et al*.,* 1999; Suzuki et al*.,* 2004).

Em 1996, dois casos de SPCVH foram descritos na região sudoeste do estado de São Paulo, nas cidades de Araraquara e Franca. O genoma de hantavírus encontrado nestes pacientes permitiu identificar um novo vírus, que foi denominado *Araraquara* (ARAV) (Johnson et al*.,* 1999; SuzukI et al., 2004).

Nos últimos 14 anos, muitos novos casos de SPCVH têm ocorrido em todo o Brasil, predominando na região Sudeste e Sul onde a atividade agrícola e o desmatamento da vegetação nativa tem sido intensos (Machado, 2007).

Em 2003, foram descritos 2 novos hantavírus em tecidos de roedores silvestres capturados na região norte do país. Estes foram denominados de *Anajatuba* (ANAJV) e *Rio Mamoré* (RIOMV) e agrupam-se próximos filogeneticamente, podendo ser apresentados como uma única espécie (Rosa et al*.,* 2005).

### 1.2 Classificação e estrutura dos hantavírus

Os *Hantavirus* são um gênero pertencente à família *Bunyaviridae. São reconhecidos cerca de* 30 genótipos distintos de *Hantavirus*, dos quais, até o presente, 21 são patogênicos para o homem, entretanto, outros podem ainda estar por vir a ser descoberto, devido a ausencia de casos descritos na Africa, Oriente Médio e India (Jonsson et al*.,* 2010; Ellioti et al*.,* 2000; Vapalahti et al*.,* 1996).

Os hantavírus, são virus esféricos, com diâmetro de 73 a 150 nm, possuindo um envoltório com projeções de glicoproteínas na superfície (Gn e Gc) de aproximadamente 7 nm que encontram-se fixadas nas duas camadas lipidicas (Lednicky et al*.,* 2003; Kanerva et al*.,* 1998) (Figura 1). Estas glicoproteínas são do tipo I transmembrânicas e possuem como função atuar como receptores de membrana celular permitindo a entrada do vírus nas diversas células receptoras (macrófagos e células endoteliais, entre outras) (Gavrilovskaya et al*.,* 1999).

Os *hantavirus* possuem um genoma RNA de fita simples, com polaridade negativa e trisseguimentado, contendo seqüências nucleotídicas complementares nas extremidades 3' e 5' de cada seguimento, o que permite que o RNA viral se mantenha circular dentro do *virion* (Plyusnin et al., 1996; Maes et al., 2004). Esta complementariedade é altamente conservada e sua função estaria relacionada à replicação viral (Machado, 2007).

Os segmentos do genoma viral são denominados: L (*large* - grande) que possui aproximadamente 6500 nucleotídeos e codifica uma RNA polimerase dependente de RNA (240 a 260 Kda) responsável pela transcrição e replicação do genoma viral. O segmento M (*medium* - médio) com aproximadamente 3600 a 3800 nucleotídeos que codifica um precursor poliproteíco (GPC) que será clivado formando as duas glicoproteínas de superfície do vírus (Gn e Gc). O segmento S (*small* - pequeno), com 1300 a 2100 nucleotídeos, é responsável pela codificação da proteína do nucleocapsideo viral N (Nichol et al*.,* 1993; Plyusnin, 2002).

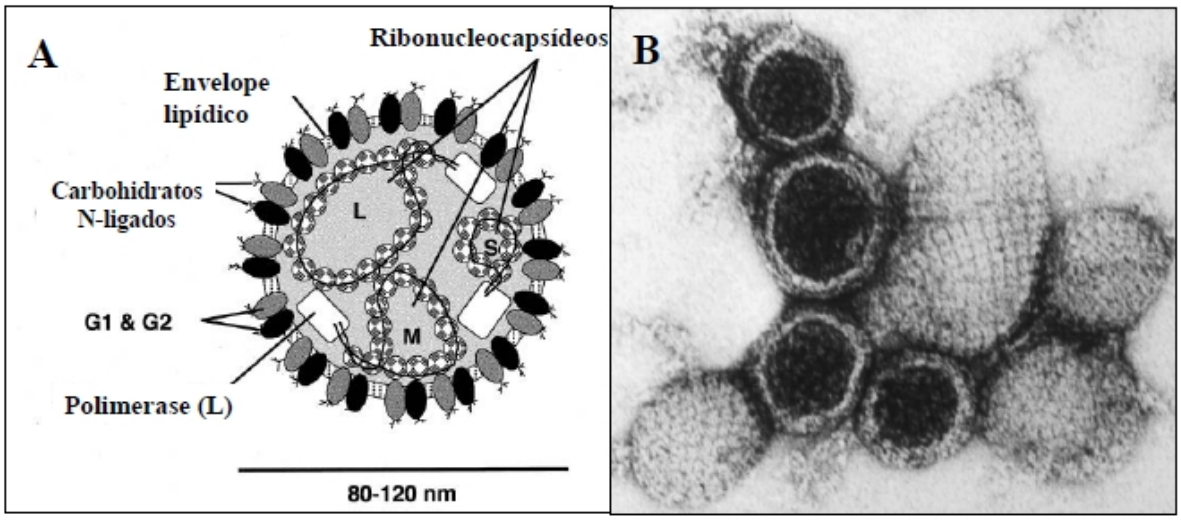


**Figura 1 – A** Representação esquemática da morfologia de *virions* de *Bunyaviridae*. Os três segmentos genômicos de RNA (S, M, e L) são complexados com a proteína do nucleocapsídeo para formar estruturas de ribonucleoproteína. Os nucleocapsídio e a RNA polimerase dependentes de RNA são empacotados dentro de um envelope lipídico que contém glicoproteínas virais, Gn e Gc. Não há proteína de matriz. Adaptado de S chmaljohn e H ooper (2001).
**B** Microscopia eletrônica do vírus Hantaan (gênero *Hantavirus*), aumento de 135.000 x. Adaptado de Nichol (2001).
**Fonte:** Borges (2006).

### *1.2.1 Replicação dos hantavírus*

A adesão dos hantavírus às células-alvo acontece pela ligação das glicoproteínas (Gn e Gc) virais com receptores de integrinas. Os hantavírus considerados não patogênicos ligam-se a um tipo especifico de integrinas chamadas de B1, já os patogênicos ligam-se a integrinas B3, que são receptores de células do sistema imune, plaquetas, entre outras (Gavrilovskaya et al., 1999; Raymond et al., 2005).

Após a ligação aos receptores a partícula viral penetra por endocitose e o envelope lipídico funde-se ao endossomo ocorrendo à liberação do RNA e da polimerase viral. Em seguida, começa imediatamente a transcrição das ribonucleoproteínas virais produzindo os mRNAs (Gavrilovskaya et al., 1999; Ra ymond et al., 2005). Os mRNAs derivados dos segmentos S e L são traduzidos por ribossomos livres formando a proteína N de aproximadamente 54 Kda e a RNA polimerase dependente de RNA de aproximadamente 260 Kda (Hutchinson et al., 1996). O segmento M é traduzido por ribossomos ligados a membrana, formando um precursor poliproteico que será posteriormente clivado por peptidases do hospedeiro, formando as glicoproteinas Gn e Gc (figura 2) (Gavrilovskaya et al., 1998). As proteínas Gn, Gc e N são imunogênicas para o hospedeiro infectado, levando à produção de anticorpos neutralizanles contra seus epitopos (Garcin et al., 1995; Raymond et al., 2005).

Concomitante ao processo de transcrição e tradução das proteinas virais, ocorre a replicação genômica dos *hantavírus*. Esta se inicia quando a RNA polimerase dependente de RNA muda sua função de transcriptase para replicase resultando na cópia do RNA viral total (Garcin et al., 1995). Após a replicação do material genômico os *virions* são formados por brotamento do citoplasma para o interior de vesículas do aparelho de Golgí onde há alta concentração das proteínas Gn e Gc. Por não possuirem proteína de matriz, para ligação do envelope e ribonucleoproteínas, é provável que ocorra interação direta entre os ribonucleocapsideos e as proteínas do envelope viral localizadas no *lumem* das vesículas. Após o brotamento os *virions* são transportados à superfície da célula e secretados por exocitose (figura 2) (Hutchinson et al., 1996).

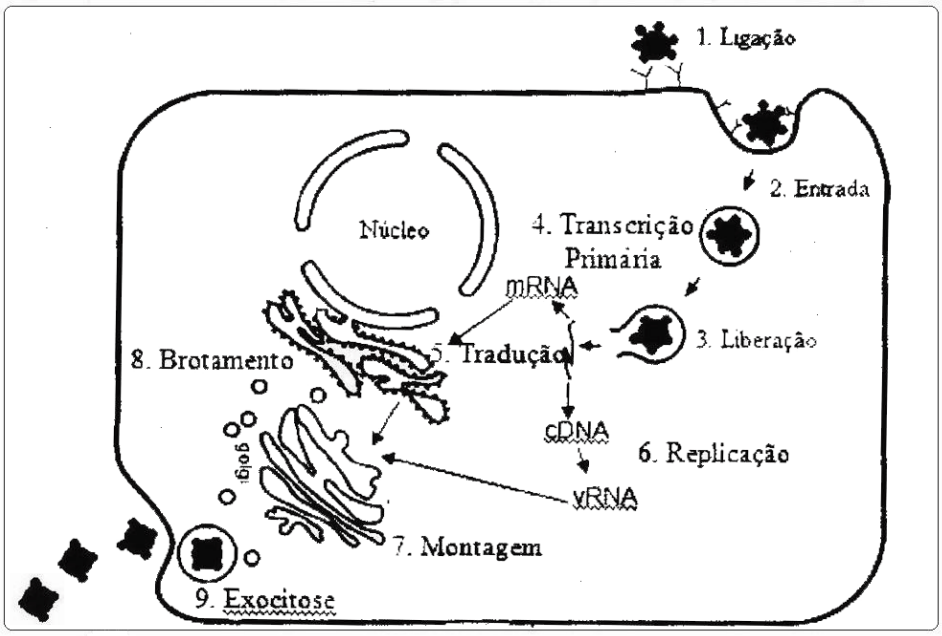


**Figura 2 – Replicação dos *Hantavirus*.** 1. Ligação da partícula viral à célula-alvo pelas glicoproteinas e receptores de membrana integrinas. 2. Entrada via endocitose mediada por interação das glicorpoteínas e o receptor. 3. Fusão da membrana do endossamo e liberação dos ribonucleocapsídios e da RNA polimerase no citoplasma. 4. Transcrição primária. 5. Tradução das proteinas virais. 6. Replicação do RNAv via cRNA intermediário. 7. Montagem dos virions no aparelho de Golgi. 8. Brotamento das novas partículas virais. 9. Saída por exocitose.
**Fonte:** Machado (2007).

### 1.3 Distribuição dos hantavírus.

São conhecidas 2 doenças humanas distintas causadas por hantavírus: a Febre Hernorrágica com Síndrome Renal (FHSR). que ocorre principalmente na Ásia e Europa, e a Síndrome Pulmonar e Cardiovascular (SPCVH), que ocorre nas Américas (Verity et al., 2000; Kanerva et al., 1998). A FHSR pode ser causada por vários agentes etiológicos e entre eles se destacam os vírus *Hantaan*, *Seoul*, *Dobrava*, *Puumala*, entre outros. Quanto à SPCVH, própria das Américas, os principais vírus envolvidos são o *Sin nombre*

(SNV), *New York* (NYV), *Bayou* (BAYV), *Black Creeck Canal* (BCCV), *Laguna Negra* (LNV), *Andes* (ANDV), *Lechiguanas* (LECV), *Oran* (ORNV), *Juquitiba* (JUQV), *Araraquara* (ARAV) e *Castelo dos Sonhos* (CASV). A distribuição destes vírus na América costuma ser específica sendo que grupos virais presentes em uma região mantêm diferenças genômicas e de reservatório com os outros grupos (Silva-Vergara et al., 2002) (Figura 3).

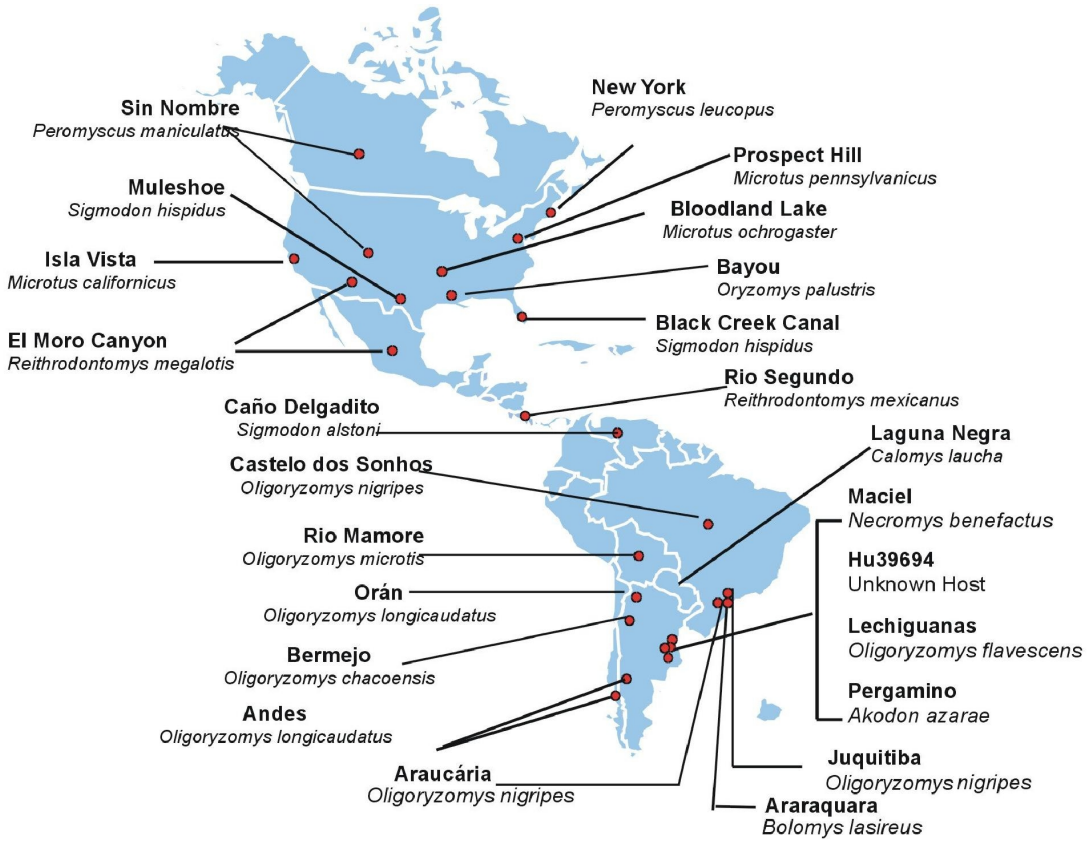


**Figura 3 –** Distribuição geográfica de alguns hantavírus do novo mundo (Américas e no Brasil), incluindo seus locais de origem e roedores-reservatórios.
**Fonte**: Brada (2010).

## 1.4 Epidemiologia

### *1.4.1 Transmissão*

Em contraste com outros vírus da família *Bunyaviridae,* os hantavírus não possuem transmissão por vetores, mas sim por aerossóis provenientes da excreta (urina, fezes e saliva) de pequenos mamíferos, principalmente roedores silvestres cronicamente infectados. Estes se mantêm assintomáticos e levam consigo o vírus por meses e até anos (figura 4) (Plyusnin et al., 1996; Simmons e RIley, 2002).

A infecção humana por hantavírus depende do contato do homem com roedores silvestres cronicamente infectados. Este contato ocorre principalmente durante atividades agrícolas, como plantação e armazenamento de cereais, demolição de construções rurais

entre outras como mostra a figura 4 (Ferreira, 2003). De modo geral, indivíduos adultos da área rural apresentam maior risco de infecção (Nichol, 2001).

A transmissão inter-humana de hantavírus causando SPCVH foi descrita na Argentina e no Chile (Enria et al., 1996; Wells et al., 1997; Padula et al., 1998; Martinez et al., 2005), tendo como agente etiológico o vírus *Andes* (ANDV), ocorrendo durante a fase prodrômica da doença (Martinez et al., 2005).

O crescente desmatamento da vegetação típica, para realização de monoculturas, tem propiciado o deslocamento de roedores antes estritamente silvestres, para regiões rurais ou peri-urbanas, onde a abundância de alimentos gera condições de sobrevivência (Figueiredo, 2003a).

Outras formas de transmissão, menos frequentes, incluem mordidas de roedores contaminados, bem como ingestão de alimentos contendo partículas virais provenientes da urina ou fezes de roedores (Peters et al., 1998; Simpson, 1998).

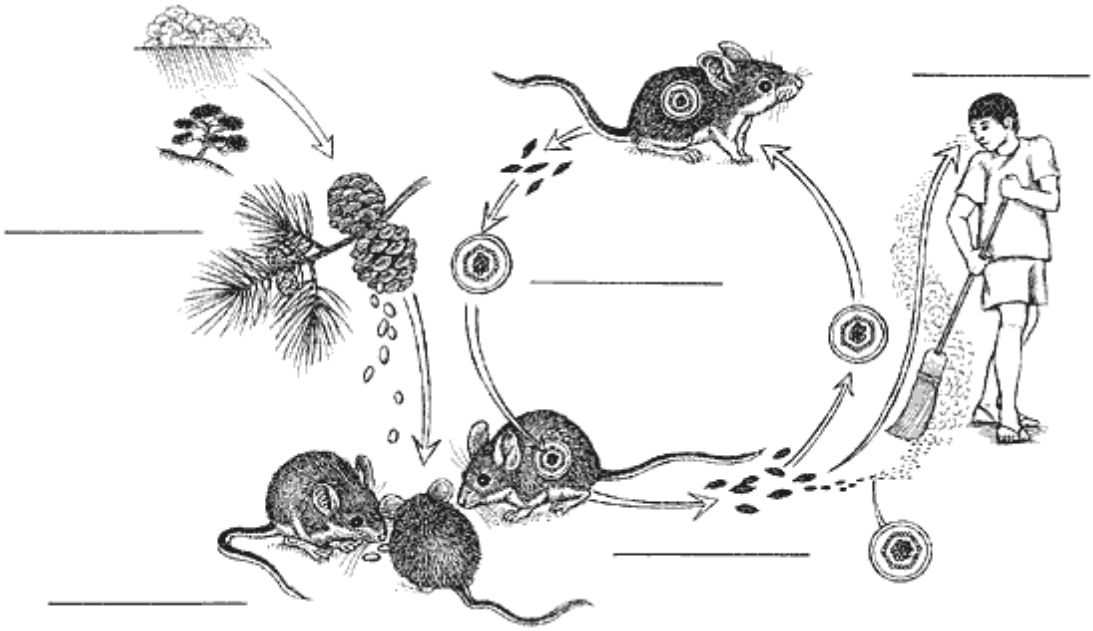

**Figura 4 – Esquema do processo de infecção por hantavírus.** O aumento das chuvas leva a um aumento na disponibilidade de alimentos. Como conseqüência há um aumento na quantidade de roedores silvestres que podem estar infectados por hantavírus. Estes roedores não apresentam sintomatologia alguma e quando defecam e/ou urinam eliminam partículas virais. Os aerossóis produzidos por estas secreções, contendo as partículas virais, quando inalados podem infectar o ser humano e/ou os roedores.
**Fonte**: Machado (2007).

### *14.2 Reservatórios naturais dos hantavírus*

O *habitat* do roedor-reservatório de cada hantavírus limita-se a uma região geográfica (tabela 1). Acreditava-se que vírus e roedores tenham co-evoluído de forma intima, já que existe especificidade entre cada hantavírus e seu roedor-reservatório, numa

determinada região geográfica (Plyusnin et al., 2002; Figueiredo et al., 2006; Suzuki et al., 2004; Pini et al., 2004). Entretanto, essa hipótese de co-divergência / co-evolução precisa ser reavaliada à luz de novas informações, já que foi demostrando que os hantavírus evoluiriam cerca de 10.000 vezes mais rápido do que os seus reservatórios roedores e que os mesmos teriam cerca de 800 anos apenas de evolução (Ramsden et al*.,* 2008; Ramsden et al., 2009).

Na Europa, os roedores das subfamílias *Murínae* e *Arvícolínae,* particularmente os pertencentes aos gêneros *Apodemus* e *Clethrionomys,* são os principais reservatórios de hantavírus causadores da FHSR (CDC, 2000; CDC, 1993).

Nas Américas, a grande maioria dos roedores que transmitem a hantavirose pertence á subfamília *Sigmodontinae*. Nos estados Unidos, os transmissores mais frequentes são os *Peromyscus manículatus* e *leucopus*. Na Argentina, onde vários hantavírus foram descritos, os principais roedores-reservatório são do gênero *Olígoryzomys*, em particular, O. *flavescens* e O. *longicaudatus* (Tischler et al., 2005), como mostrado na Tabela 1.

É possível que outros roedores, não mencionados, também, sejam reservatórios naturais de hantavírus, já que, provavelmente, ainda não se conhece a totalidade destes vírus.

**Tabela 1 –** Principais hantavirus, suas origens, doenças humanas associadas aos mesmos e seus reservatórios-naturais. (*) Sorotipos oficialmente reconhecidos pelo Comitê Internacional sobre Taxonomia Viral.

| **Vírus**<br>Ordem *Rodentia*<br>Família *Muridae* | **Doença** | **Sigla** | **Reservatório** | **Localidade** |
|---|---|---|---|---|
| **Sufamília *Murinae*** | | | | |
| Hantaan * | FHSR | HTN | *Apodemus agrarius* | China, Rússia, Coréia |
| Dobrava * | FHRS | DOB | *Apodemus flavicolis* | Bálcãs |
| Saaremaa | FHRS | SAA | *Apodemus agrarius* | Europa |
| Seoul* | FHRS | SEO | *Rattus novergicus, R. rattus* | Cosmopolita |
| Thailand * | ND | THAI | | Tailândia |
| **Sufamília *Arvicolinae*** | | | | |
| Puumala | FHRS | PUU | *Clethionomys* | Europa, Escandinavia, Russia |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | *glareolus* | |
| Topografov* | ND | TOP | *Lemmus sibiricus* | Sibéria |
| Prospect Hill* | ND | PH | *Microtus pennsylvanicus* | Estados Unidos |
| Bloodland Lake | ND | BLL | *Microtus ochrogaster* | América do Norte |
| Khabarovsk * | ND | KBR | *Microtus fortis* | Califórnia |
| Amur virus | FHSR | AMR | *Apodemus peninsulae* | Rússia |
| Isla vista* | ND | ISLA | *Microtus californicus* | Estados Unidos (oeste) e México |
| Tula virus* | ND | TUL | *Lemmus sibiricus* | Europa |
| Prospect Hill-Like | | PH-like | *M. pennsyl./montanus/ ochrogaster* | América Norte |
| Pergamino | ND | PRG | *Akodon azarae* | América Central |
| **Subfamília *Sigmodontinae*** | | | | |
| **América do Norte** | | | | |
| Sin Nombre* | SPCVH | | *Peromyscus maniculatus* | Estados Unidos |
| Monongahela | SPCVH | MGL | *Peromyscus maniculatus* | Estados Unidos (leste) e Canadá |
| New York virus* | SPCVH | NY | *Peromycus leucopus* | Estados Unidos (leste) |
| Blue River virus | ND | BRV | *Peromycus leucopus* | Estados Unidos (região central) |
| Bayou virus* | SPCVH | BAY | *Oryzomyhs palustris* | Estados Unidos |
| Black Creeck Canal* | SPCVH | BCC | *Sigmodon hispidus* | Flórida (EUA) |
| Muleshoe* | ND | MUL | *Sigmodon hispidus* | Estados Unidos (sul) |
| Limestone Canyon | ND | LMC | *Peromyscus boylii* | Estados Unidos |
| El Moro Canyon | ND | ELMC | *Reithrodontomys* | Estados Unidos e México |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| virus | | | *megalotis* | |
| **América Central** | | | | |
| Rio Segundo* | ND | RIOS | *Reithrodontomys mexicanus* | Costa Rica |
| Maporal | ND | MAP | *Oligoryzomys fulvescens* | Venezuela |
| Calabazo virus | ND | CLB | *Zigodontomys brevicauda* | Panamá |
| **América do Sul** | | | | |
| Canõ Delgatito | ND | CD | *Sigmodon alstoni* | Venezuela |
| Andes virus | SPCVH | AND | *Oligoryzomys longicaudatus* | Argentina, Chile, Uruguay |
| Hu 39694 virus | SPCVH | Hu39694 | ND | Argentina Central |
| Maciel virus | ND | MAC | *Necromys Benefactus* | Argentina Central |
| Oran virus | ND | ORN | *Oligoryzomys longicaudatus* | Argentina (Noroeste) |
| Lechiguanas virus | SPCVH | LEC | *Oligoryzomys flavencens* | Argentina Central |
| Bermejo virus | SPCVH | BMJ | *Oligoryzomys Chacoensis* | Argentina (Noroeste) |
| Laguna Negra * | SPCVH | LN | *Calomys laucha* | Paraguay, Bolívia |
| Rio Mamoré* | ND | RM | *Olygoryzomys microtis* | Bolívia |
| *Araraquara* virus | | ARA | *Bolomys laziurus* | Brasil |
| Castelo dos Sonhos | SPCVH | CAS | ND | Brasil |
| Juquitiba* | SPCVH | JUQ | ND | Brasil |
| **Ordem *Insectivora*** | | | | |
| Thottapalayam virus* | ND | TTP | *Suncus murinus* | Índia |

**Fonte**: Moreli (2005).

### *1.4.3 Epidemiologia da hantavirose no Brasil*

Apesar da descrição inicial da SPCVH ter ocorrido nos EUA, a América do Sul superou a do Norte em número de casos, principalmente pelas ocorrências na Argentina, Brasil e Chile (Figueiredo et al., 2003a).

Desde 1993, casos de SPCVH tem sido diagnosticados em vários estados do Brasil principalmente nas regiões Sul e Sudeste, sendo que a sazonalidade da hantavirose no Brasil varia conforme a região estudada. (Suzukl et al., 2004). Até o final de 2005 um total de 626 casos já foram notificados, sendo que aproximadamente 43,6% destes morreram. Observamos que a maioria das infecções ocorreram nos estados de Paraná (19,80%), Minas Gerais (18,69%), Santa Catarina (17,89%), São Paulo (14,05%), Mato Grosso (7,98%) e Rio Grande do Sul (7,02%) onde as atividades agropecuárias constituem o trabalho de milhões de brasileiros (Tabela 2) (Santos e Garrett, 2005; Luna et al, 2006)

Até junho de 2010 foram notificados 1.258 casos de SPCVH no Brasil, com letalidade de 39,10%. Observou-se que a letalidade por SPCVH no estado de São Paulo, é bem acima da média nacional (55,72%). Podemos observar também que alguns estados que não apresentavam casos descritos da doença ha alguns anos atrás (Goiás, Rôndonia, Amazonas, entre outros), começam a notificar seus primeiros casos. (tabela 2)

Portanto, tem aumentado o conhecimento sobe o número de pessoas infectadas como consequência das constantes notificações desta doença. Entretanto, acreditamos que um número de casos ainda maior do que o notificado, passe como outra doença e não seja diagnosticado.

**Tabela 2 –** Casos de hantavirose no Brasil, desde de 1993 até julho 2010.

| U F | 1993 | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rondônia | | | | | | | | | | | | 1 | | - | 1 | 1 | | | **3** |
| Acre | | | | | | | | | | | | | | | | | | | **-** |
| Amazonas | | | | | | | | | | | | 3 | 1 | | | | | | **4** |
| Roraima | | | | | | | | | | | | | | | | | | | **-** |
| Pará | | | 1 | | | | | 1 | 1 | | 2 | 2 | 9 | 15 | 9 | 17 | 15 | 1 | **72** |
| Amapá | | | | | | | | | | | | | | | | | | | **-** |
| Tocantins | | | | | | | | | - | | | | | | | | | | **-** |
| NORTE | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 | 1 | | 2 | 6 | 10 | 15 | 10 | 18 | 15 | 1 | **79** |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Maranhão | | | | | | | | 1 | 2 | | 4 | | | 2 | | 1 | 1 | - | **11** |
| Piauí | | | | | | | | | | | | - | | | | | | | **-** |
| Ceará | | | | | | | | | | | | | | | | | | | **-** |
| R.G.do Norte | | | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | | | | **2** |
| Paraíba | | | | | | | | | | | | | | | | | | | **-** |
| Paraíba | | | | | | | | | | | | | | | | | | | **-** |
| Pernanbuco | | | | | | | | | | | | | | | | | | | **-** |
| Alagoas | | | | | | | | | | | | | | | | | | | **-** |
| Sergipe | | | | | | | | | | | | | | | | | | | **-** |
| Bahia | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | **1** |
| NORDESTE | - | - | - | 1 | - | - | 1 | 1 | 3 | | 4 | - | - | 2 | - | 1 | 1 | - | **14** |
| Minas Gerais | - | - | - | - | - | 2 | 3 | 9 | 5 | 14 | 21 | 39 | 39 | 34 | 27 | 19 | 24 | - | **236** |
| Espirito Santo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | **-** |
| Rio de Janeiro | | | | | | | | | | | | | | | | | | | **-** |
| São Paulo | 3 | - | - | 2 | - | 5 | 10 | 1 | 8 | 15 | 17 | 10 | 11 | 9 | 19 | 16 | 10 | 1 | **136** |
| SUDESTE | 3 | - | - | 2 | - | 7 | 13 | 10 | 13 | 29 | 38 | 49 | 50 | 43 | 46 | 35 | 34 | 1 | **372** |
| Paraná | | | | | | | 7 | 24 | 30 | 15 | 14 | 10 | 48 | 10 | 6 | 10 | 10 | 1 | **184** |
| Santa Catarina | | | | | | | 1 | 5 | 16 | 11 | 16 | 41 | 23 | 50 | 19 | 17 | 12 | 7 | **211** |
| R.G. do Sul | | | | | | 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 | | | | | | | 3 | 2 | 10 | 11 | 5 | 9 | 12 | 49 | 29 | 21 | 26 | 12 | **177** |
| M.G.do Sul | | | | | | | | | | | | | | - | | | | | **-** |
| Goiás | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | 2 | 9 | 5 | 5 | 6 | 10 | 13 | 2 | **51** |
| D. Federal | | | | | | | | | | | | 27 | 16 | 5 | 7 | 3 | 9 | 9 | **67** |
| CENTRO OESTE | - | - | - | - | - | - | 3 | 3 | 10 | 11 | 7 | 45 | 33 | 59 | 42 | 34 | 48 | 23 | **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** | **34** | **1253** |

**Fonte:** Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância Sanitária (Brasil, 2010).

## 1.5 Sindrome pulmonar e cardiovascular por hantavirus (SPCVH)

### *1.5.1 Patogênese da SPCVH*

A patogenia da SPCVH tem sido bastante estudada nos últimos anos (Raymond et al., 2005). A via respiratória é a porta de acesso do vírus ao organismo e as células endoteliais dos pequenos vasos são os principais alvos. A patogenia não é completamente causada pela simples ação viral infectando estas células mas, também, por uma resposta imune exacerbada, com grande produção de citocinas (Makela et al., 2004; Sundstrom et al., 2001; Khaiboullina et al., 2000). Portanto, a agressão do sistema imune às células infectadas, que leva a síndrome de extravasamento capilar, parece determinar a gravidade nas doenças por hantavírus. No caso da SPCVH, tal fenômeno ocorre no leito vascular pulmonar e leva a um edema pulmonar difuso com consequente insuficiência respiratória (Borges et al., 2006). As plaquetas também são afetadas na doença, estas são destruídas levando a trombocitopenia que estaria associada aos quadros hemorrágicos. Junto ao extravasarnento de líquido nos pulmões, há uma infiltração massiva de células T CD8 neste órgão. Estas células são ativadas pela presença viral e produzem citocinas estimuladoras de macrófagos locais, os quais, por sua vez, produzem fator de ativação plaquetária e leucotrienos que aumentam a permeabilidade vascular aumentando, ainda mais, o edema pulmonar e levando a insuficiência respiratória (Campos et al., 2009).

O mecanismo fisiopatológico do choque na SPCVH não foi completamente esclarecido porém, sabe-se que a hipovolemia causada pelo extravasamento de líquidos combinada a um processo inflamatório do miocárdio estão associadas ao quadro (Gavrllovskaya et al., 1998; Borges et al., 2006; Campos et al., 2009).

### *1.5.2 Manifestações clínicas*

A SCPVH, é uma doença emergente com descrição crescente de casos no Brasil. O período de incubação desta doença pode chegar há 5 semanas e infecções subclínicas ou oligossintomáticas são comuns. (Bharadwaj et al., 2000; Young et al., 2000; Jeor, 2004). Após a inalação das partículas virais e um período de incubação que varia de 3 a 33 dias surgem os sintomas e sinais clínicos (Jeor, 2004).

A fase inicial da doença (3 a 6 dias) caracteriza-se por sintomas como febre, mialgias, náuseas, diarreia, cefaléia, vômitos, dor abdominal, dor torácica, sudorese e vertigem. Existe grande dificuldade em reconhecer precocemente a SPCVH já que os sintomas são muito parecidos com os de outras doenças como o dengue, a leptospirose, a febre amarela, entre outras (Ridel et al., 2004; Hamidon e Saadlah, 2003).

Com o inicio da fase cardiopulmonar, a doença progride rapidamente aparecendo tosse e dispneia. Nesta fase, surge a insuficiência respiratória que se manifesta por taquipneia, dispneia, hipoxemia e taquicardia. Concomitante a isto, surge hipotensão que pode evoluir para o choque, e consequente depressão miocárdica. Portanto, trata-se de uma combinação de graves acometimentos pulmonares e cardiovasculares, que podem levar o paciente ao óbito (Figueiredo et al., 2001). Também, nesta fase, 30 a 70% dos pacientes apresentam transtornos hemorrágicos e insuficiência renal, que ocasionalmente, pode requerer diálise transitória.

A convalescença dos pacientes com SPCHV, especialmente daqueles que necessitaram de ventilação mecânica, costuma ser prolongada. A avaliação tardia destes pacientes pode mostrar como sequelas a fadiga crônica e restrição da função pulmonar (Figueiredo et al., 2001).

### 1.6 Imunologia das hantaviroses

Após inalação das partículas com vírus, este é fagocitado por células dendríticas ou macrófagos da mucosa de vias aéreas e alvéolo, que migram a linfonodos regionais apresentando antígenos a células T e ativando-as intensamente (Maes et al., 2004).

Grandes quantidades de células T ativadas são liberadas no sangue periférico e tecidos, sendo descritas como imunoblastos ou linfócitos atípicos. Também, células do endotélio capilar pulmonar são infectadas. Para tanto, o hantavírus infecta células utilizando como receptor de membrana ß3 integrinas (Lundkvist et al., 1993; Maes et al., 2004).

A infecção da célula endotelial inibe sua capacidade migratória em vitronectina, o que altera funcionalmente a barreira capilar-alvéolo. Também, as células endoteliais infectadas produzem quimiocinas que atraem e estimulam a ação de células CD8+ citotóxicas e mononucleares. Estas, por sua vez, liberam citocinas pré-inflamatórias incluindo TNF-α e IFN-γ, indutoras de óxido nítrico que produz vasodilatação local (Lundkvlst et al., 1994; Maes et al., 2004).

As citocinas pré-inflamatórias, atuam de forma sinérgica à alteração de barreira capilar estimulando o extravasamento de líquido ao interstício e edema pulmonar. Plaquetas, que possuem ß3 integrinas, se infectam e são destruídas participando do processo vascular, bem como de fenômenos hemorrágicos que ocorrem na SPCVH. O TNF-α, também, atua deprimindo a função miocárdica, que leva ao choque cardiogênico (Lundkvlst et al., 1994; Maes et al., 2004).

Correlaciona-se o nível de ativação das células CD8+ com gravidade da SPCVH. Os casos fatais possuem teores muito elevados destas células no sangue periférico. Por outro lado, à atuação de anticorpos neutralizantes está associada à redução na carga viral e à cura da doença, bem como à proteção contra re-infecções por hantavírus (Simpson, 1998)

### 1.7 Diagnostico das hantaviroses

O diagnóstico das infecções por hantavírus baseia-se na realização de testes sorológicos e na detecção de genoma viral por RT-PCR. O isolamento viral não se mostra factível na prática clínica diária (Peters et al., 1998; Lundkvist et al., 1994; Kallo-Kokko et al., 1993). O teste imunoenzimático ELISA, é o mais utilizado para este tipo de diagnóstico. Outros testes sorológicos disponíveis são a imunofluorescência indireta (IFA), a neutralização de anticorpos, hemaglutinação passiva e o W*estern Blotting* (WB), mas estes não são frequentemente utilizados devido ao alto custo (Ksiazek et al., 1995; Padula et al., 2000; Groen et al., 1989).

A RT-PCR pode identificar o RNA viral em amostras de sangue ou tecidos provenientes de casos suspeitos de infecção em humanos nos primeiros 7 a 10 dias de doença (de Paula et al., 2002; Soares et al., 2005; Moreli et al., 2004). Embora os "*primers"* utilizados sejam sensíveis para amplificação e provenientes de sequências genômicas obtidas de vírus encontrados em tecidos humanos ou de roedores, existem diferenças significativas entre os vírus isolados de cada região ou país, diminuindo a sensibilidade da técnica para uso padrão no diagnóstico das hantaviroses (Garin et al., 2001).

A imunohistoquímica é outra técnica utilizada para o diagnóstico anatomo patológico das infecções por hantavírus. Esta é aplicada aos tecidos onde buscam-se identificar antígenos virais, sendo utilizada em casos fatais. Também, diagnósticos retrospectivos podem ser realizados por essa técnica (Heiske et al., 1999; Ferreira, 2003).

Em 2000, Bharadwaj et al., desenvolveram o "*Focus Reduction Neutralization Test*" (FRNT), que é utilizado para se verificar a existência dos anticorpos neutralizantes contra antígeno do nucleocapsídio N do vírus *Sin Nombre (SN)*, já que demonstra e quantifica as placas formadas *("focus")* pela infecção viral em células Vero-E6. (figura 5)

Em 1997, Hjelle et al., desenvolveram um teste rápido para diagnóstico de infecções por hantavírus. Trata-se de um "*Immunoblotting*" de pequenas tiras ("*strips"*), utilizando como antígeno proteínas recombinantes (G1 e nucleocapsídio) dos vírus *Seoul* e *SN*.

No Brasil o diagnóstico da infecção por hantavírus é comumente realizado pela detecção de anticorpos IgM e ou IgG contra antígenos (principalmente a proteína do núcleo-capsideo N) do SNV ou ANDV, por ELISA. Estes antígenos costumam ser fornecidos pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta, USA) ou pelo Instituto Carlos Malbran (Buenos Aires, Argentina) (Padula et al*.,* 2000; Moreli et al., 2004). Entretanto, no Brasil, tais testes sorológicos só são realizados em 3 grandes centros de referência (Institutos Adolfo Lutz, Evandro Chagas e Oswaldo Cruz) devido principalmente a dificuldade de obtenção dos antígenos que não são produzidos no país ( Moreli et al*.,* 2004).

O teste sorológico com antígeno de SNV não é totalmente específico para os hantavírus brasileiros e as reações ocorrem por reação cruzada, ou seja, os anticorpos contra nucleoproteína de hantavírus brasileiros ligam-se inespecificificamente à proteína N do SNV. (Moreli et al*.,* 2004; Figueiredo et al., 2009; Mazzarotto et al*.,* 2009).

Portanto, faz-se necessário desenvolver antígenos de hantavírus brasileiros, o que aumentaria significativamente a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos além de diminuir o custo já que, não seria mais necessário importar este material para realização do diagnóstico (Padula et al*.,* 2000; Suzuki et al*.,* 2004).

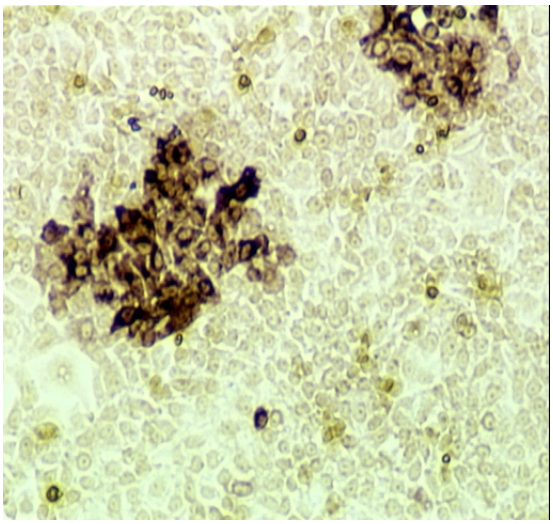

**Figura 5 –** Foto em microscópio óptico, da reação de neutralização de anticorpo (FRNT), com aumento de 40x. **Fonte**: Foto cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Brian Hjelle (UNM, USA).

### 1.8 Produção de antígenos para testes diagnósticos

A produção de antígenos nativos para os testes sorológicos apresenta várias limitações, entre elas o alto risco envolvido na manipulação do hantavírus, para o qual é necessário um laboratório com nível de biossegurança 3 (Vapalahti et al., 1996; Ksiazek et al., 1995; Billecoq et al., 2003). Outras limitações para o uso dos antígenos nativos são os baixos títulos obtidos em cultura de células, dificuldade de adaptação do vírus às células, crescimento lento (3 a 10 dias) e mutações nas sequências de nucleotídeos geradas pelas sucessivas passagens em cultura de células.

Estas mutações geram proteínas defeituosas que podem interferir na replicação viral atenuando a virulência e diminuindo a produção viral em culturas de células (Temonem et al., 1993; Elliot et al., 1994; Lundkvist et al., 1994).

Devido às razões citadas, os antígenos de hantavírus produzidos pela técnica do DNA recombinante estão se tornando padrão nos testes sorológicos (Ksiazek et al., 1995; Billecocq et al., 2003; Koraka et al., 2000). O gene N, que codifica a nucleoproteína viral, é frequentemente usado para a produção de antígenos recombinantes (Elgh et al., 1997; Gott et al., 1997; Xu et al., 2002).

Isto se deve ao fato desta proteína ser um dos principais antígenos na infecção, sendo que altos títulos de imunoglobulina M (IgM) anti-nucleoproteína são detectados principalmente na fase aguda da infecção viral, a partir dos primeiros dias de infecção (Gott et al., 1997; Xu et al., 2002). A imunoglobulina G (IgG) começa a aparecer já na fase aguda da infecção e estende sua permanência até depois da fase de convalescença, sendo que décadas após a infecção, ainda, pode ser detectada (Settergren et al., 1991; Hujakka et al., 2003).

Em 2005, Moreli produziu uma proteína N recombinante do vírus *Araraquara* em *Escherichia coli* no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Moreli, 2005; Figueiredo et al., 2008). O gene desta proteína, isolado a partir do RNA viral extraído do soro de paciente da região de Ribeirão Preto, foi clonado no plasmídeo pET Directional TOPO® (Invitrogen, USA) e multiplicado em células *Escherichia coli* BL21 DE3 (Invitrogen, USA).

A expressão da proteína N recombinante foi confirmada por "W*estern Blotting"* (52kda).A proteína recombinante foi purificada em colunas de níquel após solubilização em uréia e se mostrou adequada ao uso como antígeno em testes realizados com soros de pacientes infectados com hantavírus e em estudos sorológicos com roedores selvagens (Moreli, 2005; Figueiredo et al., 2008).

Em 2006, Raboni da Universidade Federal do Paraná, também produziram uma proteína recombinante de nucleocapsídio do vírus *Araucária.* O gene desta proteína, foi amplificado a partir do RNA viral extraído do soro de pacientes com SCPVH. Posteriormente, este gene foi clonado em plasmídeo e multiplicado em células *Escherichia coli*, para depois ser purificado em coluna de afinidade. (Raboni et al, 2007; Mazzarotto et al, 2009).

## CONCLUSÕES

- O ELISA de triagem utilizando a proteína recombinante (nucleocapsídio) do vírus *Araraquara* demonstrou ser confiável e reprodutível, contribuindo ao sistema de diagnóstico da hantavirose.

- Os resultados obtidos entre as regiões estudadas demonstrou uma maior circulação de hantavirus na região sub tropical do que na região topical do Brasil.

## REFERÊNCIAS*


Bharadwa JM, Nofchissey R, Goade D, Koster F, Hjelle B. Humoral immune responses in the hantavirus cardiopulmonary syndrome. J Infect Dis. 2000 Jul;182(1):43-8.

Bharadwa JM, Lyons CR, Wortman IA, Hjelle B. Intramuscular inoculation of Sin Nombre hantavirus cDNAs induces cellular and humoral immune responses in BALB/c mice. Vaccine 17(22): 2836-2843, 1999.

Billecocq A, Coudrier D, Boue F, Combes B, Zeller H, Artois M, et al. Expression of the nucleoprotein of the Puumala virus from the recombinant Semliki Forest virus replicon: characterization and use as a potential diagnostic tool. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul;10(4):658-63.

Borges AA, Campos GM, Moreli ML, Souza RL, Aquino VH, Saggioro FP, et al. Hantavirus cardiopulmonary syndrome: immune response and pathogenesis. Microbes Infect. 2006 Jul;8(8):2324-30.

Brada SJ. Estudo sorológico retrospectivo sobre a hantavirose no município de cássia dos coqueiros, no período de 1986 a 1991. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Hantavirose: casos e óbitos confirmados totais, 1993-2010 (dados preliminares até 9 de julho de 2010). Comunicação pessoal via e-mail.

Brus Sjölander K and Å Lundkvist. Dobrava virus infection: serological diagnosis and cross-reactions to other hantaviruses. J. Virol. Methods. 1999. 80:137–143.

Campos GM, Borges AA, Badra SJ, Figueiredo GG, Souza RL, Moreli ML, et al. Pulmonary and cardiovascular syndrome due to hantavirus: clinical aspects of an emerging disease in southeastern Brazil]. Rev Soc Bras Med Trop. 2009 May-Jun;42(3):282-9.

Campos GM, Moro de Sousa RL, Badra SJ, Pane C, Gomes UA, Figueiredo LT. Serological survey of hantavirus in Jardinopolis County, Brazil. J Med Virol. 2003 Nov;71(3):417-22.

Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Hantavirus pulmonary syndrome, United Stades 1993 MMWR 42:421-424.

Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Hantavirus pulmonary syndrome. Panama 1999 - 2000 MMWR 49:205-207.

da Silva MV, Vasconcelos MJ, Hidalgo NT, Veiga AP, Canzian M, Marotto PC, et al. Hantavirus pulmonary syndrome. Report of the first three cases in Sao Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1997 Jul-Aug;39(4):231-4.


---

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: samples references. Avaliable from : http://www.icmje.org [2007 May 22].

de Paula SO, PIres-Neto RJ, Correa JA, Assumpcao SR, Costa ML, Lima DM, et al. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection and identification of dengue virus in an endemic region: a validation study. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2002; 96(3): 266-269.

Elgh F, Lundkvist A, Alexeyev OA, Stenlund H, Avsic-Zupanc T, Hjelle B, et al. Serological diagnosis of hantavirus infections by an enzyme-linked immunosorbent assay based on detection of immunoglobulin G and M responses to recombinant nucleocapsid proteins of five viral serotypes. J Clin Microbiol. 1997 May;35(5):1122-30.

Elliott LH, Ksiazek TG, Rollin PE, Spiropoulou CF, Morzunov S, Monroe M, et al. Isolation of the causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. Am J Trop Med Hyg. 1994 Jul;51(1):102-8.

Elliott LH, Ksiazek TG, Rollin PE. Isolation ofthe causative agent of hantavirus pulrnonary sfdrome. American Journal Tropical Medlclne and Hygiene. 2000; 51(1): 102-108.

Enria D, Padula P, Segura EL, Pini N, Edelstein A, Posse CR, et al. Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. Possibility of person to person transmission. Medicina (B Aires). 1996;56(6):709-11.

Fenoy S, Rodero M, Pons E, Aguila C, Cuellar C. Follow-up of antibody avidity in BALB/c mice infected with Toxocara canis. Parasitology. 2008 May;135(6):725-33.

Ferreira MS. [Hantaviruses]. Rev Soc Bras Med Trop. 2003 Jan-Feb;36(1):81-96.

Ferrer JF, Jonsson CB, Esteban E, Galligan D, Basombrio MA, Peralta-Ramos M, et al. High prevalence of hantavirus infection in Indian communities of the Paraguayan and Argentinean Gran Chaco. Am J Trop Med Hyg. 1998 Sep;59(3):438-44.

Figueiredo LT, Campos GM, Rodrigues FB. [Hantavirus pulmonary and cardiovascular syndrome: epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis and treatment]. Rev Soc Bras Med Trop. 2001 Jan-Feb;34(1):13-23.

Figueiredo LT, Moreli ML, Borges AA, de Figueiredo GG, Badra SJ, Bisordi I, et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on Araraquara virus recombinant nucleocapsid protein. Am J Trop Med Hyg. 2009 Aug;81(2):273-6.

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. [Viral hemorrhagic fevers in Brazil]. Rev Soc Bras Med Trop. 2006 Mar-Apr;39(2):203-10.

Figuelredo LT, Souza MLT, Carvalho RCR, Barbas VCS, Pincelli PM. Síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavirus. J Pneumol. 2003 a 29(5):309-323.

Figueiredo LT. Moreli ML, Campos GM, Sousa RL. Hantaviruses in São Paulo state, Brazil. Emerg. Infect. Dis., Atlanta, v.9, n.7, p.891-892, 2003 b.

Frey MT, Vial PC, Castillo CH, Godoy PM, Hjelle B, Ferres MG. Hantavirus prevalence in the IX region of Chile. Emerg. Infect. Dis., Atlanta, v.9, n.7, p.827-832, 2003.

Garcin D, Lezzi M, Dobbs M, Elliott RM, Schmaljohn C, Kang CY, et al. The 5' ends of Hantaan virus (Bunyaviridae) RNAs suggest a prime-and-realign mechanism for the initiation of RNA synthesis. J Virol. 1995 Sep;69(9):5754-62.

Garin D, Peyrefitte C, Crance JM, Le Faou A, Jouan A, Bouloy M. Highly sensitive Taqman PCR detection of Puumala hantavirus. Microbes Infect. 2001 Jul;3(9):739-45.

Gavrilovskaya IN, Brown EJ, Ginsberg MH, Mackow ER. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. J Virol. 1999 May;73(5):3951-9.

Gavrilovskaya IN, Shepley M, Shaw R, Ginsberg MH, Mackow ER. beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jun 9;95(12):7074-9.

Gonzalez LM, Lindsey AE, Hjelle B, Dominguez D, Brown J, Goade D, et al. Prevalence of antibodies to Sin Nombre virus in humans living in rural areas of southern New Mexico and western Texas. Virus Res. 2001 Apr;74(1-2):177-9.

Gott P, Zoller L, Darai G, Bautz EK. A major antigenic domain of hantaviruses is located on the aminoproximal site of the viral nucleocapsid protein. Virus Genes. 1997;14(1):31-40.

Groen J, van der Groen G, Hoofd G, Osterhaus A. Comparison of immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays for the serology of Hantaan virus infections. J Virol Methods. 1989 Feb;23(2):195-203.

Hamidon BB, Saadiah S. Seoul hantavirus infection mimicking dengue fever. Med J Malaysia. 2003 Dec;58(5):786-7.
Hedman KM, Lampalainen MI, So¨derlund M, Hedman, L. Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. Reviews in Medical Microbiology 1993 4, 123–129.

Heiske A, Anheier B, Pilaski J, Klenk HD, Grone HJ, Feldmann H. Polymerase chain reaction detection of Puumala virus RNA in formaldehyde-fixed biopsy material. Kidney Int. 1999 May;55(5):2062-9.

Hjelle B, Jenison S, Torrez-Martinez N, Herring B, Quan S, Polito A, et al. Rapid and specific detection of Sin Nombre virus antibodies in patients with hantavirus pulmonary syndrome by a strip immunoblot assay suitable for field diagnosis. J Clin Microbiol. 1997 Mar;35(3):600-8.

Holmes R, Boccanera R, Figueiredo LT, Mancano SR, Pane C. Seroprevalence of human hantavirus infection in the Ribeirao Preto region of Sao Paulo State, Brazil. Emerg Infect Dis. 2000 Sep-Oct;6(5):560-1.

Hujakka H, Koistinen V, Kuronen I, Eerikainen P, Parviainen M, Lundkvist A, et al. Diagnostic rapid tests for acute hantavirus infections: specific tests for Hantaan, Dobrava and Puumala viruses versus a hantavirus combination test. J Virol Methods. 2003 Mar;108(1):117-22.

Hutchinson KL, Peters CJ, Nichol ST. Sin Nombre virus mRNA synthesis. Virology. 1996 Oct 1;224(1):139-49.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE . Dados demográficos e sócio econômicos. Disponível em: http://www.ibge.gov.br. [2009 out. 15].

Iversson LB, da Rosa AP, de Rosa JT. [Serological studies in research on arbovirus antibodies in the human population of the Ribeira Valley region. II - Survey of patients of Pariquera-Acu Regional Hospital, 1980]. Rev Saude Publica. 1981 Dec;15(6):587-602.

Jeor SC. Three-week incubation period for hantavirus infection. Pediatric Infect. Dis J. 2004; 23(10):974-975.

Johnson AM, de Souza LT, Ferreira IB, Pereira LE, Ksiazek TG, Rollin PE, et al. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. J Med Virol. 1999 Dec;59(4):527-35.

Jonsson CB, Figueiredo LT, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. Clin Microbiol Rev. 2010 Apr;23(2):412-41.

Kallio-Kokko H, Vapalahti O, Hedman K, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A. Puumala virus antibody and immunoglobulin G avidity assays based on a recombinant nucleocapsid antigen. J Clin Microbiol. 1993 Mar;31(3):677-80.

Kanerva M, Mustonen J, Vaheri A. Pathogenesis of puumala and other hantavirus infections. Rev Med Virol. 1998 Apr;8(2):67-86.

Khaiboullina SF, Netski DM, Krumpe P, St Jeor SC. Effects of tumor necrosis factor alpha on sin nombre virus infection in vitro. J Virol. 2000 Dec;74(24):11966-71.

Koraka P, Avsic-Zupanc T, Osterhaus AD, Groen J. Evaluation of two commercially available immunoassays for the detection of hantavirus antibodies in serum samples. J Clin Virol. 2000 Sep 1;17(3):189-96.

Ksiazek TG, Peters CJ, Rollin PE, Zaki S, Nichol S, Spiropoulou C, et al. Identification of a new North American hantavirus that causes acute pulmonary insufficiency. Am J Trop Med Hyg. 1995 Feb;52(2):117-23.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lednicky JA. Hantaviruses. a short review. Arch Pathol Lab Med. 2003 Jan;127(1):30-5.

Lee HW, Lee PW, Lahdevirta J, Brummer-Korventkontio M. Aetiological relation between Korean haemorrhagic fever and nephropathia epidemica. Lancet 1979 Jan 27;1(8109):186-7.

Lee HW. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. Rev Infect Dis. 1989 May-Jun;11 Suppl 4:S864-76.

Levis S, Rowe JE, Morzunov S, Enria DA, St Jeor S. New hantaviruses causing hantavirus

pulmonary syndrome in central Argentina. Lancet 1997 Apr 5;349(9057):998-9.

Luna EIA, Elkhoury MR. Desafios para a vigilancia e controle da síndrome cardiopulmonar por hantavirus. Bol Eletrônico Soc Bras Med Trop. Disponível em: www.sbmt.orglboletin/1lldesafios.pdf. [2006 set. 21].

Lundkvist A, Horling J, Niklasson B. The humoral response to Puumala virus infection (nephropathia epidemica) investigated by viral protein specific immunoassays. Arch Virol. 1993;130(1-2):121-30.

Lundkvist A, Niklasson B. Hemorrhagic fever with renal syndrome and other hantavirus infections. Rev Med Virol. 1994;4:177-184.

Machado AM. Construção de baculovírus recombinates contendo o gene da nucleoproteína do hantavirus *Araraquara*. [dissertação]. São Paulo (Brasil): Universidade de Mogi das Cruzes; 2007.

Maes P, Clement J, Gavrilovskaya I, Van Ranst M. Hantaviruses: immunology, treatment, and prevention. Viral Immunol. 2004;17(4):481-97.
Maes P, Klempa B, Clement J, Matthijnssens J, Gajdusek DC, Kruger DH, et al. A proposal for new criteria for the classification of hantaviruses, based on S and M segment protein sequences. Infect Genet Evol. 2009 Apr 23.

Makela S, Mustonen J, Ala-Houhala I, Hurme M, Koivisto AM, Vaheri A, et al. Urinary excretion of interleukin-6 correlates with proteinuria in acute Puumala hantavirus-induced nephritis. Am J Kidney Dis. 2004 May;43(5):809-16.
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 Dec;11(12):1848-53.

Mazzarotto GA, Raboni SM, Stella V, Carstensen S, de Noronha L, Levis S, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of Araucaria hantavirus. J Virol Methods. 2009 Aug 3.

Mendes WS, da Silva AA, Aragao LF, Aragao NJ, Raposo Mde L, Elkhoury MR, et al. Hantavirus infection in Anajatuba, Maranhao, Brazil. Emerg Infect Dis. 2004 Aug;10(8):1496-8.

Monroe MC, Morzunov SP, Johnson AM, Bowen MD, Artsob H, Yates T, et al. Genetic diversity and distribution of Peromyscus-borne hantaviruses in North America. Emerg Infect Dis. 1999 Jan-Feb;5(1):75-86.

Moreli LM. Diagnóstico de Hantavirus por detecção genômica com estudo filogenético e produção de uma proteina N recombinante. [tese]. Ribeirão Preto (Brasil): Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2005.

Moreli ML, Sousa RL, Figueiredo LT. 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 Oct;99(6):633-8.

Mustonen J, Partanen J, Kanerva M, Pietila K, Vapalahti O, Pasternack A, et al. Genetic susceptibility to severe course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. Kidney Int. 1996 Jan;49(1):217-21.

Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, et al. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. Science. 1993 Nov 5;262(5135):914-7.

Nichol ST. Bunyaviruses. In: Knipe AM, Howley PM. Field's Virology. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Willians & Wilkins, 2001. v.2. p.1603-1633. 1. CD ROOM.

Padula PJ, Edelstein A, Miguel SD, Lopez NM, Rossi CM, Rabinovich RD. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. Virology. 1998 Feb 15;241(2):323-30.

Padula PJ, Rossi CM, Della Valle MO, Martinez PV, Colavecchia SB, Edelstein A, et al. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. J Med Microbiol. 2000 Feb;49(2):149-55.

Peters CI. HPS in the Americas. In: Ccheld WM, Craig WA, Hughes JM. Emerging Infectious. Washington DC: ACM Press; 1998. p. 17-64.

Pini N. Hantavirus pulmonary syndrome in Latin America. Curr Opin Infect Dis. 2004 Oct;17(5):427-31.

Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. J Gen Virol. 1996 Nov;77 ( Pt 11):2677-87.

Plyusnin A. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. Arch Virol. 2002 Apr;147(4):665-82.

Raboni SM, Levis S, Rosa ES, Bisordi I, Delfraro A, Lemos E, et al. Hantavirus infection in Brazil: development and evaluation of an enzyme immunoassay and immunoblotting based on N recombinant protein. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007 May;58(1):89-97.

Raboni SM. Caracterização molecular de hantavírus : estudos filogenéticos e geração de insumos para o diagnóstico e prevenção da hantavirose. [Tese] Universidade Federal do Paraná. 2006.

Ramsden C, Holmes EC, Charleston MA. Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. Mol Biol Evol. 2009 Jan;26(1):143-53.

Ramsden C, Melo FL, Figueiredo LM, Holmes EC, Zanotto PM. High rates of molecular evolution in hantaviruses. Mol Biol Evol. 2008 Jul;25(7):1488-92.

Raymond T, Gorbunova E, Gavrilovskaya IN, Mackow ER. Pathogenic hantaviruses bind plexin-semaphorin-integrin domains present at the apex of inactive, bent alphavbeta3 integrin conformers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jan 25;102(4):1163-8.

Ridel GM, Luis IR, Teja J. [Emerging and reemerging diseases: a health problem in the Americas]. Rev Panam Salud Publica. 2004 Apr;15(4):285-7.

Riquelme R, Riquelme M, Torres A, Rioseco ML, Vergara JA, Scholz L, et al. Hantavirus pulmonary syndrome, southern Chile. Emerg Infect Dis. 2003 Nov;9(11):1438-43.

Rôndonia. Governo do Estado de Rôndonia Disponível em: http://www.rondonia.ro.gov.br/conteudo.asp?id=180. [2010 jul. 15].

Rosa ES, Mills JN, Padula PJ, Elkhoury MR, Ksiazek TG, Mendes WS, et al. Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. Vector Borne Zoonotic Dis. 2005;5(1):11-9.

Safronetz D, Lindsay R, Hjelle B, Medina RA, Mirowsky-Garcia K, Drebot MA. Use of IgG avidity to indirectly monitor epizootic transmission of sin nombre virus in deer mice (Peromyscus maniculatus). Am J Trop Med Hyg. 2006 Dec;75(6):1135-9.

Santos ED, Garrett DO. Epidemiol Serv Saúde. 2005;14(1):1

Settergren B, Ahlm C, Juto P, Niklasson B. Specific Puumala IgG virus half a century after haemorrhagic fever with renal syndrome. Lancet. 1991 Jul 6;338(8758):66.

Silva-Vergara ML, Costa JC, Jr., Barata CH, Curi VG, Tiveron CG, Jr., Teixeira AC. Hantavirus pulmonary syndrome in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Sep;97(6):783-7.

Simmons JH, Riley LK. Hantaviruses: an overview. Comp Med. 2002 Apr;52(2):97-110.

Simonsen L, Dalton MJ, Breiman RF, Hennessy T, Umland ET, Sewell CM, et al. Evaluation of the magnitude of the 1993 hantavirus outbreak in the southwestern United States. J Infect Dis. 1995 Sep;172(3):729-33.

Simpson SQ. Hantavirus pulmonary syndrome. Heart Lung. 1998 Jan-Feb;27(1):51-7.

Soares PB, Demetrio C, Sanfilippo L, Kawanoto AH, Brentano L., Durigon EL. Standardization of a duplex RT-PCR for the detection of influenza A and NewCastle disease virus in migratory birds. Journal Virology Methods 2005; 123(2): 125-130.

Sundstrom JB, McMullan LK, Spiropoulou CF, Hooper WC, Ansari AA, Peters CJ, et al. Hantavirus infection induces the expression of RANTES and IP-10 without causing increased permeability in human lung microvascular endothelial cells. J Virol. 2001 Jul;75(13):6070-85.

Suzuki A, Bisordi I, Levis S, Garcia J, Pereira LE, Souza RP, et al. Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil. Emerg Infect Dis. 2004 Dec;10(12):2127-34.

Tager Frey M, Vial PC, Castillo CH, Godoy PM, Hjelle B, Ferres MG. Hantavirus prevalence in the IX Region of Chile. Emerg Infect Dis. 2003 Jul;9(7):827-32.

Temonen M, Vapalahti O, Holthofer H, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Lankinen H. Susceptibility of human cells to Puumala virus infection. J Gen Virol. 1993 Mar;74 ( Pt 3):515-8.

Terajima M, Vapalahti O, Van Epps HL, Vaheri A, Ennis FA. Immune responses to Puumala virus infection and the pathogenesis of nephropathia epidemica. Microbes Infect. 2004 Feb;6(2):238-45.

Tischler ND, Galeno H, Rosemblatt M, Valenzuela PD. Human and rodent humoral immune responses to Andes virus structural proteins. Virology. 2005 Apr 10;334(2):319-26.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Sep;76(9):4350-4.

Vapalahti O, Lundkvist A, Kallio-Kokko H, Paukku K, Julkunen I, Lankinen H, et al. Antigenic properties and diagnostic potential of puumala virus nucleocapsid protein expressed in insect cells. J Clin Microbiol. 1996 Jan;34(1):119-25.

Vasconcelos MI, Lima VP, Iversson LB, Rosa MD, da Rosa AP, da Rosa ES, et al. 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.

Verity R, Prasad E, Grimsrud K, Artsob H, Drebot M, Miedzinski L, et al. Hantavirus pulmonary syndrome in northern Alberta, Canada: clinical and laboratory findings for 19 cases. Clin Infect Dis. 2000 Oct;31(4):942-6.

Vincent MJ, Quiroz E, Gracia F, Sanchez AJ, Ksiazek TG, Kitsutani PT, et al. Hantavirus pulmonary syndrome in Panama: identification of novel hantaviruses and their likely reservoirs. Virology. 2000 Nov 10;277(1):14-9.

Wells RM, Sosa Estani S, Yadon ZE, Enria D, Padula P, Pini N, et al. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. Emerg Infect Dis. 1997 Apr-Jun;3(2):171-4.

Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, Palma RE, Vera I, De Velasquez F, et al. An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome in western Paraguay. Am J Trop Med Hyg. 1997 Sep;57(3):274-82.

Xu X, Severson W, Villegas N, Schmaljohn CS, Jonsson CB. The RNA binding domain of the hantaan virus N protein maps to a central, conserved region. J Virol. 2002 Apr;76(7):3301-8.

Yanagihara R, Chin CT, Weiss MB, Gajdusek DC, Diwan AR, Poland JB, et al. Serological evidence of Hantaan virus infection in the United States. Am J Trop Med Hyg. 1985 Mar;34(2):396-9.

Young JC, Hansen GR, Graves TK, Deasy MP, Humphreys JG, Fritz CL, et al. The incubation period of hantavirus pulmonary syndrome. Am J Trop Med Hyg. 2000 Jun;62(6):714-7.