



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SOROPREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR HANTAVÍRUS EM  
INDIVÍDUOS RESIDENTES DE MUNICÍPIOS DO ESTADO DO  
AMAZONAS

BÁRBARA BATISTA SALGADO

MANAUS  
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BÁRBARA BATISTA SALGADO

SOROPREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR HANTAVÍRUS EM  
INDIVÍDUOS RESIDENTES DE MUNICÍPIOS DO ESTADO DO  
AMAZONAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani

MANAUS  
2016

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S164s Salgado, Bárbara Batista  
Soroprevalência de infecção por Hantavírus em indivíduos  
residentes de municípios do estado do Amazonas / Bárbara Batista  
Salgado. 2016  
140 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Pritesh Jaychand Lalwani  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. hantavírus. 2. epidemiologia. 3. soroprevalência. 4. diagnóstico.  
5. Amazonas. I. Lalwani, Pritesh Jaychand II. Universidade Federal  
do Amazonas III. Título

**BÁRBARA BATISTA SALGADO**

**SOROPREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR HANTAVÍRUS EM  
INDIVÍDUOS RESIDENTES DE MUNICÍPIOS DO ESTADO DO  
AMAZONAS**

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas e aprovada em sua versão final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto  
Coordenador PPGCF

Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos professores:

Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani, Presidente  
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – FIOCRUZ

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Prof. Dr. Gemilson Soares Pontes  
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Manaus, 6 de dezembro de 2016

À minha linda família  
e aos amigos que acreditaram com entusiasmo na finalização dessa etapa.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, primeiramente, pelo dom da vida. Pela presença nos pequenos feitos e detalhes na rotina maluca que poucas vezes percebemos. Por estar ao lado sempre, principalmente nos momentos descrentes e de tentações equivocadas. Por ajudar a nos manter firmes e com fé de que no final tudo sempre vai dar certo no exato momento que deve ser.

À umas das principais responsáveis por essa conquista, minha mãe Filomena. Vai muito além de suporte e de apoio. Amor de mãe é imensurável, interminável e indestrutível. Qualidades, virtudes, caráter, educação e respeito são frutos desse amor e dos ensinamentos. Em especial, quero agradecer a sua tolerância e cuidado intermitentes nessa minha jornada que, por muitas vezes, sequer falei um “obrigada” nos pequenos gestos.

A todos da minha família Batista e Salgado, principalmente os moradores da mesma residência, que aturaram com muita bravura e perseverança todo e qualquer tipo de estresse e nas circunstâncias mais árduas. Ao meu pai Antônio, pelo zelo e preocupação silenciosa. À minha irmã Clarice, por tornar a minha vida mais leve e engraçada e entender meus momentos. Ao meu irmão Wlader, pelo jeito único e peculiar de viver. Ao meu avô Clóvis, pela aproximação e conversas sempre prazerosas. Às secretárias por todas as refeições feitas com muito carinho. Aos primos, tios, madrinha, padrinho e avós pela confiança, palavras e estímulos fundamentais. Um agradecimento especial às minhas avós Santina e Neomiza pelo eterno cuidado, preocupação e “comida de vó”.

Ao meu pai Wladimir, pelo amor, por toda a iluminação e a oportunidade de viver o mundo. Pelo privilégio dessa proteção divina que me segue em todos os meus passos, não apenas dele, mas daqueles que eu sei e sinto que estão sempre comigo.

A minha vida é repleta de vários tipos de amizades. Aprecio carinhosamente todas elas. As amigas, praticamente irmãs, de longas datas que estão comigo em qualquer ocasião. As amigas sem tempo ruim que perdem a amiga, mas não perdem a piada. As amigas construídas na faculdade de modo peculiar. As amigas de longa distância. As amigas provenientes de outros amigos. Todos as amigas criam laços afetivos, temporários ou não, para gerar lembranças, experiências, sentimentos e crescimento pessoal.

Eu, literal e definitivamente, não teria conseguido prosseguir e finalizar esse processo sem as suas palavras, seu amparo incondicional e sua dedicação em me apoiar, Barbara. Nunca vou ter palavras suficientes para demonstrar tudo. Obrigada pela paz, pelo conforto e por fazer parte da minha vida.

Quero agradecer às Instituições de apoio, como CAPES e FAPEAM, que investiram e proporcionaram a execução desse projeto.

Aos diretores das instituições HEMOAM do município de Manaus; LACEN, FMT e Hospital Regional de Coari; e Empresa Mil Madeireira de Itacoatiara pelo apoio na execução do trabalho e das coletas nesses locais.

A todos os voluntários participantes desse projeto pela permissão da coleta de sangue e paciência na coleta de dados durante a realização do questionário epidemiológico.

À minha Instituição UFAM e Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em nome dos professores e servidores que realmente contribuíram para uma melhor formação de profissional que quero ser.

Aos integrantes do setor de Biotecnologia e Microbiologia da UFAM, pelo imensurável apoio nesse projeto, principalmente ao Dr. Spartaco e Dr. Carlos Gustavo pela liberação do espaço institucional. À Dra. Enedina pelo acompanhamento em inúmeras etapas desse projeto e horas disponibilizadas para ensinar e resolver problemas. Ao prof. Dr. Edmar e à Anita pelo apoio durante as etapas de extração e purificação.

Às professoras Dra Cristina e Dra Aya, pelo amparo na disponibilização de materiais e equipamentos e ensinamento de técnicas que integraram o trabalho.

Ao professor Dr. Boechat pelo auxílio na análise dos dados. À professora Dra Jaila pelas correções e revisão do projeto.

Aos integrantes do Grupo de Pesquisa e amigos que ajudaram nas coletas das amostras.

Ao meu Grupo de Pesquisa de Doenças Infecciosas e Imunologia (IDI) pelo acompanhamento e colaboração nos momentos felizes e difíceis desse trabalho, além das prazerosas horas de reuniões e convívio no laboratório. A hierarquia e a união continuam sempre juntas! Um agradecimento a todos os “Bom dia” dados pelos colegas, principalmente os da Aguyda, Maria e Adriane. Não menos importante, Nadielle, Thiago, Fábio, Juliana, Marjorie, Amanda, Fernanda, Marcos, Rodrigo e Marissa.

Um agradecimento singular a minha querida amiga Rafaella pelo tratamento único de todos os dias e pelo grande e exclusivo companheirismo.

Um agradecimento mais do que especial ao meu eterno amigo e parceiro de labuta incansável, o otimista Renato, durante todo esse tempo de mestrado, e futuramente doutorado.

Ao meu orientador, prof. Dr. Pritesh Lalwani, pela confiança e dedicação frente aos seus alunos e ao ramo da pesquisa. Por todos os ensinamentos e aprendizagem gigantescos. Por ampliar a minha visão sobre a real essência e importância da pesquisa e a captação de conhecimento em qualquer área. Por melhorar minha maneira de estudar, pesquisar e escrever, bem como mostrar a sagacidade da área da educação.

Por fim, meus sinceros e fortes agradecimentos àqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram nesse triunfo recheado de surpresas e conhecimento.

“Faça, você, a sua história.”

## RESUMO

### **SOROPREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR HANTAVÍRUS EM INDIVÍDUOS RESIDENTES DE MUNICÍPIOS DO ESTADO DO AMAZONAS**

Os *Hantavírus* são alguns dos responsáveis por enfermidades emergentes potencialmente letais para os humanos. Esses agentes negligenciados constituem a família Bunyaviridae. A infecção por *Hantavírus* ocorre mediante contato direto ou inalação de aerossóis oriundos de secreções e excretas de roedores infectados. Nos humanos, essa enfermidade se apresenta principalmente de duas formas clínicas: febre hemorrágica com síndrome renal, prevalente na Europa e Ásia, ou síndrome cardiopulmonar por *Hantavírus*, prevalente nas Américas. A forma cardiopulmonar é responsável por alta taxa de mortalidade, variando entre 40 e 100%. Embora seja um vírus endêmico na região Amazônica, há poucos registros de casos e dados epidemiológicos. O intuito deste estudo foi descrever a epidemiologia do *Hantavírus* nas populações dos municípios de Manaus, Coari e Itacoatiara, do estado do Amazonas, indicando a natureza de fatores de risco associados. Para isso, amostras de sangue de indivíduos foram coletadas de outubro de 2014 a junho de 2016, e questionários epidemiológicos e sócio demográficos foram aplicados. Realizamos um alinhamento múltiplo de sequências da nucleoproteína de espécies de *Hantavírus* identificadas na Região Amazônica. A sequência construída foi otimizada para clonagem e expressão em sistema bacteriano. A proteína expressa e purificada por afinidade foi usada como antígeno recombinante na padronização de testes sorológicos para detecção de anticorpos IgG anti-*Hantavírus*, como ensaio imunoenzimático (ELISA) e confirmação por DotBlot. O segmento S produzido foi confirmado por sequenciamento e a análise filogenética indicou que a proteína tem maior proximidade a espécies de *Hantavírus* circulantes na Amazônia e na América do Sul. Testamos um total de 1.419 amostras, distribuídas por Manaus (n=713), Coari (n=642) e Itacoatiara (n=65). Encontramos uma prevalência global de 11,35% (161 soropositivos) e relativa de 6,6% (47), 16% (103) e 17% (11), em Manaus, Coari e Itacoatiara, respectivamente. Os achados epidemiológicos mais relevantes estão relacionados ao município, sexo feminino, classe etária mais velha, baixo nível socioeconômico, ocupação (agropecuários e florestais), histórico antigo ou recente de trabalho com agricultura, manutenção de alimentos da colheita, armazenamento de grãos, presença de roedores nos domicílios e/ou locais de trabalho e não possuir rede esgoto. Conclui-se que a prevalência encontrada foi maior em relação a estudos anteriores realizados no Amazonas e associações de risco encontradas foram pertinentes nas populações. Os dados apresentados nesse estudo foram relevantes e contribuirão para uma maior compreensão da distribuição do *Hantavírus* no bioma amazônico.

**Palavras-Chave:** hantavírus, epidemiologia, soroprevalência, diagnóstico, Amazonas.

## ABSTRACT

### **SEROPREVALENCE OF HANTAVIRUS INFECTION IN RESIDENTS INDIVIDUALS OF MUNICIPALITIES OF AMAZONAS STATE**

The Hantavirus are one of responsible for potentially deadly emerging disease in humans. These neglected agents belong to Bunyaviridae family. The Hantavirus infection occurs by direct contact or inhalation of aerosols from infected rodents secretion and excretion. In humans, this disease mainly present two clinical forms: hemorrhagic fever with renal syndrome, prevalent in Europe and Asia, or hantavirus cardiopulmonary syndrome, prevalent in the Americas. The cardiopulmonary form is responsible for high mortality rate. Although a endemic virus in the Amazon region, there are few records of cases and epidemiological data. The aim of this study was describe the Hantavirus epidemiology in populations of Manaus, Coari and Itacoatiara municipalities, Amazonas state, showing the associated risk factors nature. Blood samples were collected from october 2014 to june 2016 and epidemiological and socio-demographic questionnaires were applied. We performed a multiple sequence alignment of nucleoprotein from Hantavirus species identified in the Amazon region. The constructed sequence was optimized for cloning, expression on bacterial system. The expressed and affinity-purified protein was used as recombinant antigen on serological tests patterning for anti-Hantavirus IgG antibody detection, as enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) and confirmation by Dot Blot. The generated S segment was confirmed through sequencing and phylogenetic analysis showed that protein has greater proximity to current Hantavirus species in Amazon and South America. We examined 1,419 samples, distributed across Manaus (n=713), Coari (n=642) and Itacoatiara (n=65). We found a global prevalence of 11,35% (161 seropositives) and relative prevalence of 6,6% (47), 16% (103) e 17% (11), in Manaus, Coari and Itacoatiara, respectively. The more relevant epidemiological findings are related to municipality, females, older age group, low socioeconomic status, occupation (agricultural and forests), ancient or recent history of farming work, food crop maintenance, grain storage, presence of rodents in dwelling and/or workplace and no sewage. We concluded the prevalence found was greater than in previous studies fulfilled in Amazonas and associated risk factors were pertinent in the populations. The presented data in this inquiry were relevant and will contribute to greater understanding of Hantavirus distribution in amazon biome.

**Keywords:** hantavirus, epidemiology, seroprevalence, diagnosis, Amazonas.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E GRÁFICOS

Figura 1. Representação esquemática da morfologia de uma partícula viral da família Bunyaviridae.....	26
Figura 2. Representação esquemática de replicação do <i>Hantavírus</i> .....	30
Figura 3. Ciclo de transmissão do <i>Hantavírus</i> .....	35
Figura 4. Delineamento e Fluxograma experimental do trabalho. ....	48
Figura 5. Representação geográfica dos locais de coletas. ....	49
Figura 6. Representação esquemática do vetor comercial pBSK contendo o fragmento da proteína N_AM_Hanta .....	53
Figura 7. Representação esquemática do mapa físico do vetor de expressão pGSHP .....	54
Figura 8. Processo de extração da proteína N_AM_Hanta .....	60
Figura 9. Desenho experimental da microplaca do teste de ELISA .....	65
Figura 10. Cálculo do ponto de corte ( <i>cut-off</i> ) e interpretação dos resultados no ensaio de ELISA.....	67
Figura 11. Padronização do teste de Dot Blot .....	69
Figura 12. Representação esquemática da sensibilização das membranas de nitrocelulose para o teste de Dot Blot .....	69
Figura 13. Interpretação dos resultados na membrana de nitrocelulose no teste de Dot Blot..	71
Figura 15. Gel de agarose em eletroforese com os plasmídeos pBSK e pGSHP extraídos .....	73
Figura 16. Digestão enzimática e purificação da proteína N_AM_Hanta e vetor pGS.....	74
Figura 17. Introdução do fragmento da proteína N_AM_Hanta no vetor de expressão pGS ..	75
Figura 18. Mapa físico do plasmídeo pGS_N_AM_Hanta. ....	76
Figura 19. Gel de poliacrilamida com perfil de expressão da proteína N_AM_Hanta .....	77
Figura 20. Gel de poliacrilamida com resultados da solubilidade da proteína N_AM_Hanta.	78
Figura 21. Curva de absorbância de purificação da proteína N_AM_Hanta e gel de poliacrilamida correspondente.....	80
Figura 22. Antigenicidade por <i>Western blotting</i> da proteína N_AM_Hanta.....	81

Figura 23. Fluxograma do resultado da análise das amostras nos imunoenaios.....	82
Figura 24. Prevalência de amostras positivas da população total por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para <i>Hantavírus</i> segundo município.....	83
Figura 25. Prevalência de amostras positivas da população total por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para <i>Hantavírus</i> segundo faixa etária. ....	85
Figura 26. Prevalência de amostras positivas da população total e entre municípios por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para <i>Hantavírus</i> segundo renda familiar mensal. ....	86
Figura 27. Prevalência de amostras positivas da população total e entre municípios por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para <i>Hantavírus</i> segundo nível de escolaridade. ....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais <i>Hantavírus</i> patogênicos causadores de FHSR grave. ....	39
Tabela 2. Principais <i>Hantavírus</i> patogênicos causadores de SCPH nas Américas. ....	41
Tabela 3. Casos de hantavirose no Brasil, de 1993 a 2016.. ....	44
Tabela 4. Informações sobre a coleta do trabalho .....	50
Tabela 6. Desenho do fragmento da proteína N_AM_Hanta .....	52
Tabela 7. Prevalência e números de amostras positivas da população total e entre municípios por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para <i>Hantavírus</i> segundo sexo. ....	84
Tabela 8. Prevalência e números de amostras positivas da população total por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para <i>Hantavírus</i> segundo faixa etária. ....	84
Tabela 9. Prevalência e números de amostras positivas da população total por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para <i>Hantavírus</i> segundo renda familiar. ....	85
Tabela 10. Prevalência e números de amostras positivas da população total e entre municípios por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para <i>Hantavírus</i> segundo ocupação .....	88
Tabela 11. Prevalência e números de amostras positivas da população total por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para <i>Hantavírus</i> segundo possíveis fatores de risco .....	89
Tabela 12. Regressão logística univariada das variáveis preditoras em relação a prevalência para <i>Hantavírus</i> .....	90
Tabela 13. Regressão logística multivariada de 2 modelos para avaliação da influência do município na prevalência para <i>Hantavírus</i> .....	91
Tabela 14. Prevalência e números de amostras positivas da população total por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para <i>Hantavírus</i> segundo sexo e faixa etária .....	92
Tabela 15. Prevalência e números de amostras positivas de homens por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para <i>Hantavírus</i> segundo possíveis fatores de risco .....	93
Tabela 16. Prevalência e números de amostras positivas da população do município de Manaus por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para <i>Hantavírus</i> segundo zona. ....	94
Tabela 17. Regressão logística multivariada de 4 modelos para avaliar as variáveis com maior influência na prevalência para <i>Hantavírus</i> entre os municípios de Manaus e Coari.....	97
Tabela 18. Prevalência e número de amostras positivas para <i>Hantavírus</i> entre os municípios de Manaus e Coari segundo fatores relacionados a contato com roedores, proximidade a área de florestamento e saneamento básico .....	98

Tabela 19. Descrição da reação enzimática e condições reacionais para a digestão da sequência codificadora da proteína N_AM_Hanta do vetor sintético pBSK-N.....	127
Tabela 20. Descrição da reação enzimática e condições reacionais para a digestão da sequência codificadora da HGPRT do vetor de expressão pGS. ....	127
Tabela 21. Descrição da reação enzimática e condições reacionais para a nova digestão e purificação da sequência codificadora da proteína N_AM_Hanta.....	128
Tabela 22. Descrição da reação enzimática e condições reacionais para a nova digestão e purificação do plasmídeo de expressão pGS linearizado. ....	128
Tabela 23. Descrição da reação enzimática e condições reacionais para a inserção da sequência codificadora da proteína N_AM_Hanta no vetor de expressão pGS.....	129
Tabela 24. Descrição da reação enzimática e condições reacionais para a confirmação e digestão da sequência codificadora da proteína N_AM_Hanta do vetor de expressão pGS. ....	129
Tabela 25. Prevalência para <i>Hantavírus</i> na população total segundo características sociais, demográficas e econômicas .....	130
Tabela 26. Prevalência para <i>Hantavírus</i> na população total segundo fatores relacionados a contato com roedores, proximidade a área de florestamento e saneamento básico.....	131
Tabela 27. Tampões utilizados nos processos de extração e purificação na proteína N_AM_Hanta. ....	132
Tabela 28. Soluções utilizadas nos processos de diálise da proteína N_AM_Hanta. ....	132
Tabela 29. Tampão de transferência do processo de <i>Western Blotting</i> . ....	132
Tabela 30. Soluções e tampões utilizados durante processo ELISA. ....	133

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANDV	vírus <i>Andes</i>
ANJV	vírus <i>Anajatuba</i>
ARAV	vírus <i>Araraquara</i>
BA	Bahia
BSA	albumina de soro bovino
CASV	vírus <i>Castelo dos Sonhos</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHOV	vírus <i>Choclo</i>
DAB	3,3',4,4' diaminobenzidine
DNA	ácido desoxiribonucleico
DO	densidade ótica
DOBV	vírus <i>Dobrava-Belgrade</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> – ensaio imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
FHSR	Febre Hemorrágica com Síndrome Renal
FMT	Fundação de Medicina Tropical
h	hora (s)
HEMOAM	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HGPRT	hipoxantina guanina fosforiboxiltransferase
HTNV	vírus <i>Hantaan</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus

IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPTG	isopropil-D-tiogalacto-piranosida
JUQV	vírus <i>Juquitiba</i>
kDa	kiloDalton
LACEN	Laboratório Central
LANV-like	vírus tipo <i>Laguna Negra</i>
LB	Luria-Bertani
LD	leite desnatado
M	Molar
mA	miliAmpèr (es)
MA	Maranhão
MG	Minas Gerais
mg	miligrama (s)
mL	mililitro (s)
mM	miliMolar
MT	Mato Grosso
N	Nucleocapsídeo
N_AM_Hanta	proteína Nucleocapsídeo do Amazonas de <i>Hantavírus</i>
NE	Nefropatia Epidêmica
ng	nanograma (s)
OR	<i>Odds Ratio</i> (“razão de chances”)
<i>overnight</i>	durante a noite
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de base

PBS	Tampão fosfato-salino
pBSK	plasmídeo BlueScript SK
pGS	plasmídeo GenScript
pGS_N_AM_Hanta	plasmídeo GenScript e Nucleocapsídeo do Amazonas de <i>Hantavírus</i>
pGSHP	plasmídeo GenScript e hipoxantina guanina fosforiboxiltransferase
PMSF	fluoreto de fenol sufonil
PUUV	vírus <i>Puumala</i>
RIOMV	vírus Rio <i>Mamoré</i>
RNA	ácido ribonucleico
RP-SP	Ribeirão Preto – São Paulo
RP <sub>b</sub>	Razão de Prevalência bruta
rpm	rotações por minuto
SC	Santa Catarina
SCPH	Síndrome CardioPulmonar por <i>Hantavírus</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SEOV	vírus <i>Seoul</i>
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SM	salário (s) mínimo (s)
SNV	vírus <i>Sin nombre</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
WB	<i>Western blotting</i>
μL	microlitro (s)
μg	micrograma (s)
χ <sup>2</sup>	Teste do Qui-Quadrado

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Geral.....	23
2.2 Específicos .....	23
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
3.1 Doenças negligenciadas, emergentes e re-emergentes .....	24
3.2 Biologia do vírus.....	25
3.3 Replicação viral .....	28
3.4 Doença clínica e aspectos epidemiológicos .....	31
3.4.1 Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) .....	32
3.4.2 Síndrome Cardiopulmonar por <i>Hantavírus</i> (SCPH).....	33
3.5 Transmissão e fatores epidemiológicos .....	35
3.6 Epidemiologia.....	38
3.6.1 Mundo .....	38
3.6.2 Américas.....	39
3.6.3 Brasil .....	42
3.6.4 Região Amazônica .....	45
3.6.5 Amazonas .....	46
4 METODOLOGIA.....	48
4.1 Delineamento e fluxograma experimental .....	48
4.2 Estudo populacional.....	49
4.2.1 Tipo de estudo .....	49
4.2.2 Descrição da população e coleta de material .....	50
4.2.3 Aspectos éticos e inquérito sorológico.....	50
4.3 Alinhamento e análise das sequências da nucleoproteína do <i>Hantavírus</i> .....	51
4.4 Análise filogenética .....	51
4.5 Desenho e otimização do fragmento da nucleoproteína recombinante.....	51
4.6 Síntese química do fragmento da nucleoproteína recombinante .....	52
4.7 Plasmídeo utilizado para expressão da proteína .....	53
4.8 Construção do plasmídeo pGSN_AM_Hanta para expressão da proteína de interesse..	54
4.8.1 Preparo de células <i>E.coli</i> eletrocompetentes .....	54
4.8.2 Transformação e clonagem dos vetores plasmidiais na hospedeira <i>E. coli</i> .....	55
4.8.3 Identificação dos fragmentos dos insertos nos plasmídeos por análise de restrição	56
4.8.4 Inserção do fragmento da proteína N_AM_Hanta no vetor de expressão pGS .....	56

4.9	Indução e expressão da proteína N_AM_Hanta .....	57
4.10	Extração e Purificação da proteína N_AM_Hanta.....	59
4.11	Quantificação da proteína N_AM_Hanta .....	61
4.12	Sequenciamento do fragmento codificador da proteína N_AM_Hanta.....	61
4.13	Antigenicidade da proteína por <i>Western Blotting</i> (WB).....	62
4.14	ELISA ( <i>enzyme linked immuno sorbent assay</i> – ensaio imunoenzimático) .....	64
4.15	Dot Blot.....	68
4.16	Análise estatística.....	71
5	RESULTADOS .....	72
5.1	Análise filogenética da proteína N_AM_Hanta.....	72
5.2	Clonagem, expressão, purificação e confirmação da proteína N_AM_Hanta.....	72
5.2.1	Análise da expressão da proteína N_AM_Hanta .....	76
5.2.2	Solubilidade e purificação da proteína N_AM_Hanta .....	77
5.2.3	Teste de antigenicidade da proteína N_AM_Hanta por <i>Western Blotting</i> (WB).....	81
5.2.4	Resultado da análise das amostras nos imunoenaios .....	82
5.3	Inquérito sorológico .....	83
5.3.1	Análise da prevalência para <i>Hantavírus</i> na população total do estudo.....	83
5.3.2	Análise da prevalência para <i>Hantavírus</i> nas populações de acordo com sexo .....	91
5.3.3	Análise da prevalência para <i>Hantavírus</i> nas populações de acordo com município.....	94
5.3.4	Comparação de fatores entre amostras positivas dos municípios de Manaus e Coari .....	95
6	DISCUSSÃO.....	99
7	CONCLUSÕES.....	111
8	PERSPECTIVAS.....	112
9	CRONOGRAMA .....	113
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	114
11	APÊNDICES .....	127
12	ANEXOS .....	134

## 1 INTRODUÇÃO

O ecossistema consiste em um arranjo de equilíbrio entre fauna, flora e seres humanos. Com a ocorrência de alterações nesse bioma, seja por motivos climáticos ou intervenção humana, uma crescente desarmonia se sucede no meio ambiente com efeitos positivos e negativos. A urbanização, por exemplo, acarreta um ciclo econômico ativo contínuo com intensa exploração da floresta nativa e desenvolvimento de atividade agrícola. Esses fatores levam a um desequilíbrio ecológico, impactando na emergência de diversos agentes infecciosos no âmbito urbano, tais como Hantavírus (KLEMPA, 2009; DOS SANTOS, et al., 2012).

Hantavirose é uma antropozoonose emergente causada por vírus do gênero *Hantavírus*, pertencente à família Bunyaviridae, sendo transmitido principalmente por roedores infectados (NICHOL et al., 1993), além outros pequenos mamíferos e insetívoros hospedeiros, como mussaranhos, toupeiras e morcegos. A diferença marcante em relação aos outros membros dessa família refere-se ao fato que os Hantavírus são os únicos cuja transmissão não ocorre por vetores artrópodes (mosquitos e carrapatos), portanto, não são arbovírus (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007; FIGUEIREDO, et al., 2014; MANIGOLD & VIAL, 2014).

Os membros da família Bunyaviridae dispõem de uma estrutura envelopada com genoma formado por três segmentos de RNA (ácido ribonucleico) de fita simples com polaridade negativa, os quais possuem a função de codificar componentes específicos importantes do vírion: nucleocapsídeo viral (N), glicoproteínas do envelope (G1/Gn e G2/Gc) e enzima RNA polimerase RNA-dependente (SCHMALJOHN & NICHOL, 2001, 2007).

As infecções por Hantavírus podem progredir e levar a uma doença grave com exibição de duas síndromes clínicas distintas e definidas por regiões geográficas: a febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR) no “Velho Mundo” (Ásia e Europa) e a síndrome pulmonar por Hantavírus, ou síndrome cardiopulmonar por Hantavírus, (SPH ou SCPH) no “Novo Mundo” (Américas) (BI et al., 2008).

Embora descoberto cerca de 40 anos atrás, os Hantavírus ainda são considerados como “vírus emergentes” devido a sua significativa progressão como patógenos humanos, disseminação para novos territórios e populações (KLEMPA, 2009) e com espécies ainda sendo descobertas, podendo ser patogênicas ou não. Essa enfermidade tem reconhecimento há quase um século, no entanto, apenas décadas seguintes uma variedade de Hantavírus foi identificada. A primeira espécie desses vírus foi descrita na década de 70, encontrada às margens do rio “Hantaan” na Coreia do Sul, sendo, por esse motivo, a nomeação do primeiro vírus como *Hantaan* (HTNV) (LEE et al., 1978; MANIGOLD & VIAL, 2014), de modo que o gênero como um todo fosse denominado, assim, *Hantavírus*.

No Brasil, o primeiro caso foi identificado na década de 90, no sudeste do país (SILVA et al, 1997). A partir desse relato, iniciaram-se investigações e inquéritos sorológicos voltados à clínica e epidemiologia da hantavirose. Constatou-se que essa doença vem sendo encontrada cada vez mais em locais atípicos e não-endêmicos, bem como novas variantes do vírus e novas espécies de roedores silvestres e urbanos envolvidos no processo de transmissão viral (WILLEMANN & OLIVEIRA, 2014).

Embora em menor proporção em relação a outros estados da Região Amazônica, o Amazonas é um estado em desenvolvimento caracterizado por determinadas atividades extrativistas. Esses fatores ocupacionais acentuam a degradação de áreas florestais preservadas com desmatamentos e invasões, ocasionando a desestabilização dos biomas naturais. Esse fato reflete na transição do ciclo silvestre para o ciclo doméstico, estreitando a interação de vetores em áreas urbanas e periurbanas e, conseqüentemente, transmissão e emergência de agentes transportadas por eles. (SANTOS et al., 2012). Os *Hantavírus* são uns dos exemplos desses patógenos emergentes que, embora sejam negligenciados no estado, são considerados endêmicos.

Em razão disso, existem diversas populações em risco e/ou com altas taxas de ocorrência e letalidade de hantavirose, porém precárias de informações e formas diagnósticas conhecidas e precisas. Uma vez que se trata de uma zoonose emergente na Amazônia, com poucos dados epidemiológicos e sociodemográficos (SANTOS et al., 2006), e por apresentar sinais clínicos similares a outras doenças endêmicas na região (OLIVEIRA et al, 2014), como dengue e outras viroses, é essencial a ampliação de conhecimento relacionado à hantavirose, cujo tratamento terapêutico é inexistente e sem vacinas.

Por esta razão, este trabalho englobou populações do estado do Amazonas, tanto da capital (Manaus) quanto dos interiores (Coari e Itacoatiara), principalmente aquelas frequentadoras dos centros de saúde do âmbito do SUS (Sistema Único de Saúde), bem como residentes em áreas periurbanas. Esse estudo contou com a aplicação de questionários que ajudou a aprimorar o conteúdo de informações vinculadas a esse patógeno e respectiva doença, sendo assim, de grande importância para determinar a estimativa da soroprevalência do *Hantavírus* no estado.

Esse projeto dispõe de recursos que podem oferecer uma maior compreensão da abrangência e dinamicidade dos fatores de risco, a correlação entre eles e a epidemiologia do *Hantavírus* em populações de diferentes localidades do estado do Amazonas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Estimar a soroprevalência de *Hantavírus* em diferentes populações do estado do Amazonas.

### 2.2 Específicos

- Produzir uma nucleoproteína recombinante a partir de espécies circulantes de *Hantavírus* na Região Amazônica para utilização como antígeno em imunoenaios;
- Avaliar a prevalência de anticorpos anti-*Hantavírus* em doadores de sangue do município de Manaus, população geral de Coari e em trabalhadores rurais de Itacoatiara;
- Investigar os possíveis fatores de risco associados à infecção por *Hantavírus*.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Doenças negligenciadas, emergentes e re-emergentes

Segundo a Organização Mundial de Saúde, mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, representando um sexto da população mundial. São consideradas doenças negligenciadas aquelas que possuem, principalmente, estreita relação e alta prevalência em regiões com condições de pobreza, bem como dificultam o desenvolvimento dos países, contribuindo para a manutenção do quadro de desigualdade. Dentre os principais exemplos de doenças negligenciadas, tem-se a dengue, doença de Chagas, esquistossomose, hanseníase e leishmaniose (BRASIL, 2010b).

As doenças negligenciadas, em sua maioria, não possuem estudos significativos e são interpretadas como assuntos desnecessários, com pouca atenção e descaso. Embora ainda haja determinado financiamento voltado para pesquisa relacionada a esse grupo de doenças, o conhecimento resultante não é convertido em novas terapias, como por exemplo, novos fármacos, vacinas e métodos diagnósticos. Essa falta de investimento pode ser advinda da carência de interesse despertado pela indústria farmacêutica, em virtude do baixo potencial de retorno lucrativo, visto que a população atingida é de baixo renda e, muitas vezes, majoritária em países em desenvolvimento (BRASIL, 2010b; SOUZA, 2010).

Os termos emergente e re-emergente em doenças infecciosas são associados a grupos de doenças que têm seus níveis de incidência alterados em função de uma série de fatores em determinada região ou grupo de indivíduos. Tais fatores podem estar divididos em sete grandes grupos: fatores demográficos; fatores sociais e políticos; fatores econômicos; fatores ambientais; fatores relacionados ao desempenho do setor saúde; fatores relacionados às mudanças e adaptação dos microrganismos e manipulação de microrganismos com finalidade de desenvolvimento de armas biológicas (LUNA, 2002).

As doenças emergentes são as que, geralmente, se manifestaram e/ou foram identificadas recentemente em população e/ou territórios específicos. Uma causa geralmente associada à emergência consiste na adoção de novas condições de transmissão. Essas condições acontecem em decorrência a modificações de características do agente infeccioso e/ou inclusão e infecção a um novo hospedeiro suscetível. Outro motivo que pode estar atrelado é a evolução de doenças raras e restritas a um patamar de problema de saúde pública, conseqüentemente, atingindo novas regiões, o qual resulta no aumento progressivo das taxas de incidência e na alteração do alcance geográfico (BRASIL, 2010a; PRASAD, 2010), como no caso do *Hantavírus*. As re-emergentes, por sua vez, são aquelas doenças existentes já conhecidas e, ao longo dos anos, foram controladas, entretanto voltaram a apresentar ameaça para saúde humana, reaparecendo como problema de saúde pública (BRASIL, 2010a).

O *Hantavírus* é considerado um patógeno negligenciado e emergente, pois abrange muitos dos fatores que são relacionados ao desinteresse, carência de investimento e ao surgimento inesperado. Essa manifestação repentina decorre de alterações climáticas e demográficas, migração da urbanização para zonas rurais, desflorestamento, agricultura, desequilíbrio ambiental, estreitamento do contato entre animais silvestres e humanos, e, assim, aumento da probabilidade de ocorrências de distúrbios (CDC, 1994; KLEMPA, 2009).

### 3.2 Biologia do vírus

O gênero *Hantavírus* pertencente à família Bunyaviridae compreende cerca de 80 espécies identificadas e relacionadas geneticamente (OLIVEIRA et al., 2014), sendo 22 delas consideradas patogênicas para os humanos. No entanto, há a possibilidade de ampliação desses números, uma vez que muitos *Hantavírus* ainda permanecem não descobertos, não detectáveis e não notificados (JONSSON, et al., 2010; MANIGOLD & VIAL, 2014).

O *Hantavírus* consiste em uma partícula viral de 80 a 120 nm de diâmetro empacotada por um envelope com bicamada lipídica, geralmente com formato esférico, contendo material

genético do tipo RNA fita simples, polaridade negativa e trissegmentado. Os segmentos consistem em S (*small* - pequeno), M (*medium* - médio) e L (*large* - grande) (Figura 1), cujas funções são codificar especificamente uma estrutura essencial do vírion. O segmento genômico S é responsável pelo nucleocapsídeo viral (denominado proteína N); o M codifica o precursor glicoproteico para processar o envelope de glicoproteínas superficiais (G1/Gn e G2/Gc) e o L gera a enzima RNA polimerase RNA-dependente, a qual atua como replicase, transcriptase e endonuclease (SCHMALJOHN & DALRYMPLE, 1983; SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

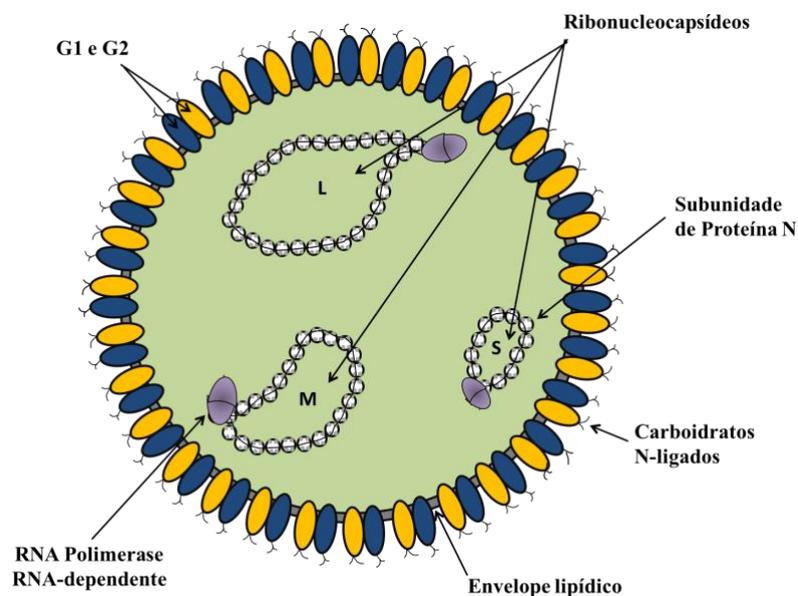


Figura 1. Representação esquemática da morfologia de uma partícula viral da família Bunyaviridae. Os três segmentos genômicos de RNA (S, M e L) complexados com a proteína N e ligados a polimerase viral formam as estruturas de ribonucleocapsídeos. Essas estruturas são empacotadas dentro de um envelope lipídico que contém glicoproteínas virais, Gn e Gc. (Fonte: Adaptado de SCHMALJOHN & HOOPER, 2001; VOGEL et al., 2007)

As proteínas Gn, Gc e N podem levar a produção de altos níveis de IgM, componente principal detectável no início dos sintomas da doença. A proteína N induz uma forte resposta imune humoral em humanos e roedores, por isso pode ser usado como um antígeno em ensaios imunoenzimáticos para o diagnóstico de infecção por *Hantavírus* (CHILDS et al., 1994; SCHMALJOHN & NICHOL, 2007). Além disso, as glicoproteínas (G1 e G2) são consideradas do tipo I transmembrânicas, as quais se ligam a receptores de membrana celular, permitindo a

entrada do vírus em diversas células, como macrófagos e células endoteliais, entre outras (GAVRILOVSKAYA et al., 1999).

Cada um dos três segmentos do genoma é composto por um filamento de RNA conjugado com proteínas (proteína N + RNA polimerase) (VOGEL et al., 2007) e, nas extremidades 3' e 5', possuem sequências nucleotídicas que se complementam, propiciando, assim, um genoma viral com topologia circular e helicoidal (PLYUSNIN et al., 1996; MAES et al., 2004). Esse pareamento de bases é uma região altamente conservada e sua função pode estar relacionada à replicação viral (MACHADO, 2007) e a distinção do *Hantavirus* em relação aos outros vírus da família Bunyaviridae (SCHMALJOHN & DALRYMPLE, 1983).

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) são usados quatro parâmetros para determinação de novas espécies de vírus dentro do gênero *Hantavírus*: (1) critério ecológico-geográfico baseado na manutenção de um único nicho ecológico de reservatório primário; (2) critério genético baseado na diferença de ao menos 7% nas sequências de aminoácidos do nucleocapsídeo (N) e precursor glicoproteico (GPC); (3) critério sorológico baseado na apresentação de ao menos uma diferença de 4 vezes no título de anticorpos no teste de neutralização cruzada; e (4) não possuir eventos de rearranjo naturais com outras espécies (PLYUSNIN et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2014, OLIVEIRA et al., 2014).

Embora esses critérios ainda persistam como fator primordial e classificatório para novos vírus, algumas publicações descrevem regularmente, desde a década de 80, a evidência de novos vírus, cepas, genótipos, espécies e linhagens por meio de uma variedade de determinações que não são padronizadas e não estão em conformidade com as propostas pela ICTV (LEVIS et al, 1998; TRAVASSOS DA ROSA et al, 2005; CHU et al, 2009; MAES, et al, 2009). Atualmente, embora haja muitos descritos mundialmente, apenas 24 espécies de *Hantavírus* são oficialmente aceitas e classificadas pelo ICTV (OLIVEIRA et al., 2014).

Existem vários modos de estabelecer a terminologia e classificação de novas espécies. A nomeação do *Hantavírus* está relacionada com o nome do local onde foi detectado e identificado pela primeira vez (PINTO JUNIOR et al, 2014). As estratégias de categorização envolvem fatores geográficos quanto aos domicílios dos reservatórios roedores (“Velho mundo” e “Novo mundo”) e fatores clínicos quanto ao tipo de manifestação exposta (febre hemorrágica com síndrome renal e síndrome cardiopulmonar por Hantavírus) (JONSSON et al., 2010; KANERVA et al., 1998; VERITY et al., 2000).

Alguns autores acreditam que essa classificação por síndromes clínicas é, em sua maior parte, didática, por isso sugerem unificar essas abordagens para termos únicos denotando a doença apenas como “hantavirose” ou “febre *Hantavírus*” (CLEMENT et al, 2012, 2014; FIGUEIREDO et al., 2014; LEE et al., 2014; KRUGER, et al., 2015). Ressalta-se que, apesar do perduro de uma divisão, os vírus que integram este gênero apresentam patogênese similar e alta porcentagem de similaridade na organização da sequência dos segmentos de RNA, diferindo somente entre cepas (JONSSON et al., 2010; KRUGER et al., 2015).

### 3.3 Replicação viral

Os Hantavírus infectam células endoteliais, epiteliais, dendríticas foliculares, macrófagos e linfócitos. O processo replicativo (Figura 2) ocorre inicialmente pela ligação das glicoproteínas virais (G1/Gn e G2/Gc) aos receptores de membrana das células-alvo, denominadas integrinas (JONSSON et al., 2010; RAFTERY et al., 2014).

Ressalta-se que a glicoproteína Gc tende a desempenhar um papel mais importante em células de artrópodes, e a Gn, em células de vertebrados (VOGEL et al., 2007). Essa última é considerada a glicoproteína mais larga e responsável pela interação com as integrinas. A integrina  $\beta 1$  é o receptor mais importante para os *Hantavírus* não-patogênicos, particularmente provenientes de roedores *Microtus*; enquanto a  $\alpha \beta 3$ , que são receptores de células do sistema

imune e plaquetas, está interligada a *Hantavírus* patogênicos (GAVRILOVSKAYA et al., 1998, 1999; RAYMOND et al., 2005). Recentemente, Raftery e pesquisadores, em 2014, evidenciaram que as integrinas  $\beta 2$  podem se complexar com outras integrinas da classe  $\alpha$ , formar receptores-complemento (CR3 e CR4) e, assim, sugerindo que esses podem ser considerados como novos receptores moleculares de entrada para *Hantavírus*.

Logo após à ligação vírus-célula hospedeira, a partícula viral a penetra por endocitose, por meio de poços revestidos com claritina, formando uma vesícula endossomal (JIN et al., 2002). Seguida da fusão da cápsula lipídica viral à membrana vesicular, as ribonucleoproteínas são liberadas do compartimento endolisossomal, por meio da redução de pH, para dentro do ambiente citoplasmático. Ocorre, então, o desnudamento parcial do genoma e a polimerase viral (RNA polimerase RNA-dependente) inicia imediatamente a transcrição dos segmentos genômicos (S, L e M) de RNA negativo, originando os RNA mensageiros (mRNAs) que poderão ser traduzidos em proteínas. A tradução dos mRNAs dos segmentos S e L ocorrem em ribossomos livres no citoplasma celular, enquanto o mRNA do segmento M é traduzido em ribossomos associados à membrana do retículo endoplasmático rugoso, codificando a poliproteína (precursora das glicoproteínas), que será clivada pelas peptidases celulares e originará as Gn e Gc. Essas serão glicosiladas e modificadas no aparelho de Golgi (GARCIN et al., 1995; JONSSON et al., 2010; HJELLE & PÉREZ., 2010; MIR & PANGANIBAN, 2010; LEE et al., 2011).

Concomitante aos processos de transcrição e tradução, a replicação genômica se inicia no momento que a polimerase viral muda sua função de transcriptase para replicase, copiando por completo o RNA viral a partir do RNA anti-genômico previamente transcrito (JONSSON & SCHMALJOHN, 2001). A morfogênese dos novos vírions ocorre pela conjugação dos RNAs genômicos recém-sintetizados com múltiplas subunidades da proteína N, formando os novos ribonucleocapsídeos, aos quais se juntam a proteína L (polimerase viral) e, seguidamente,

interagem com as caudas citoplasmáticas das glicoproteínas. Essa interação resulta na locomoção para o maquinário do complexo de Golgi, onde se adquire o envelope e ocorre o processo de montagem com posterior liberação para o meio extracelular por exocitose, sem a necessidade de lise celular (não-citopático) (VOGEL et al., 2007).

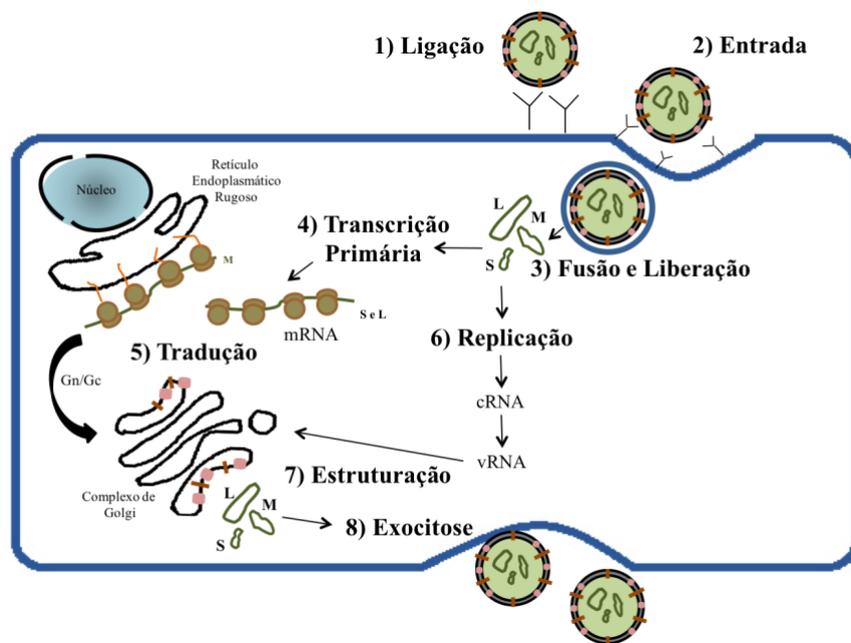


Figura 2. Representação esquemática de replicação do *Hantavírus*. 1) Ligação aos receptores celulares; 2) Internalização por endocitose; 3) Penetração por fusão do envelope com a membrana endocítica, seguida de desnudamento e liberação no citoplasma; 4) Transcrição dos segmentos de polaridade negativa e produção de mRNAs; 5) Tradução dos mRNAs e produção de proteínas envolvidas na replicação do genoma e de proteínas estruturais; 6) Replicação do RNA viral via RNA anti-genômico intermediário; 7) Formação dos vírions no complexo de Golgi; 8) Egresso por exocitose. (Fonte: Adaptado de VOGEL, 2007; JONSSON et al., 2010)

Dentre as proteínas estruturais, a proteína N é a mais abundante, sendo precocemente produzida, logo após o início da infecção. Além disso, é uma proteína multifuncional por desempenhar ações fundamentais durante todo o ciclo de vida do vírus, incluindo iniciação no processo de transcrição e tradução, assim como transporte, montagem da partícula viral e atividade imunodominante. O processo de encapsulamento dos segmentos de RNA replicados é considerado como evento central da replicação em virtude da habilidade na proteção dos genomas recém-sintetizados contra a degradação por nucleases celulares (FIGUEIREDO et al., 2008; YOSHIMATSU & ARIKAWA, 2014).

### 3.4 Doença clínica e aspectos epidemiológicos

As hantavirose são doenças agudas virais antropozoonóticas, cujas infecções em humanos variam de assintomáticas a severas. Podem evoluir de doença aguda febril inespecífica e autolimitada até quadros mais graves, conhecidos como as formas clássicas de Febre Hemorrágica com Síndrome Renal, na Ásia e Europa, e Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus, nas Américas (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2013).

Em ambas as entidades clínicas, a patogênese da hantavirose inicia pelas células endoteliais da microvascularização dos pulmões, seguido pela disseminação do vírus por via linfo-hemática para todo o corpo. Em geral, compreende alterações na coagulação sanguínea, vasodilatação e falhas na função da barreira endotelial proporcionada pelos vasos capilares, resultando, assim, no extravasamento de sangue; e resposta imune exacerbada, com liberação de citocinas, aumento da permeabilidade vascular e diversos processos inflamatórios nos órgãos-específicos afetados (VOGEL et al., 2007; BRASIL, 2013; KRUGER et al, 2015). Embora essas duas formas clínicas apresentem quadro de patogenia semelhante, diferem muito em nível de desenvolvimento clínico e taxas de fatalidade (MANIGOLD & VIAL, 2014).

O período de incubação consiste em torno de 2 a 3 semanas, apresentando os primeiros sinais da doença após esse período de exposição. Esse tempo pode variar entre 3 dias até aproximadamente 2 meses, dependendo da síndrome causadora. A sintomatologia inicial da infecção ou fase prodrômica é indiscriminável em comparação a outras doenças relacionadas a eventos agudos febris e geralmente cursa com febre, mialgia, artralgia, cefaleia, dor abdominal, indisposição, bem como fenômenos neurológicos, cardiovasculares e gastrointestinais (náusea, vômito e diarreia). Então, nesses casos, são de suma relevância o levantamento e a análise dos aspectos epidemiológicos para diagnóstico diferencial (YOUNG et al., 2000; LEDNICK, 2003; CAMPOS et al., 2009; BRASIL, 2013).

### 3.4.1 Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR)

Estudos retrospectivos sugerem registros compatíveis com essa síndrome na Europa e Ásia. Em 1913, na antiga União Soviética e China; em 1932, no Japão; e em 1934, foram notificados na Escandinávia e Leste Europeu os primeiros casos, possivelmente associados aos vírus *Puumala*, causando Nefropatia Epidêmica (NE) (ZETTERHOLM, 1934; MYHRMAN, 1934), e vírus *Dobrava-Belgrade*, respectivamente (apud:COLLIER & OXFORD 2000).

Contudo, apenas na década de 50, a FHSR obteve destaque e importância quando acometeu com febre hemorrágica em torno de 3.000 soldados das Nações Unidas durante a Guerra da Coreia e 7% desses foram a óbito (SMADEL, 1953; SCHMALJOHN & HJELLE, 1997). Era uma enfermidade de causa desconhecida e teve o isolamento do agente etiológico apenas duas décadas depois, em 1976, quando o coreano Lee e outros pesquisadores identificaram o vírus *Hantaan* (HTNV) dos tecidos do roedor silvestre *Apodemus agrarius* (LEE et al., 1978). No mesmo ano, foi confirmada a relação entre o *Hantavírus* isolado e os quadros de febre hemorrágica com síndrome renal ocorridos anteriormente (LEE, 1989). Essa forma clínica persiste no mundo desde o início do século XIX, apresentando curso autolimitado.

A partir do isolamento do HTNV, verificou-se que a expansão de FHSR em diversos países asiáticos e europeus, como Japão, China, Manchúria e Rússia, estendendo-se também para outros países do sudoeste asiático. Em 1986, foi identificada na África. Atualmente, a FHSR mostra-se endêmica na Ásia, especificamente na China e na Coreia e, na Europa, nos países escandinavos (Finlândia, Suécia, Noruega), em alguns países dos Balcãs, como Eslovênia e Croácia, além de França, Alemanha e Grécia (LEE, 1989).

A forma FHSR é reconhecida por diversas nomenclaturas em diferentes regiões do mundo: nefrosenefrite hemorrágica, na antiga União Soviética; febre songo ou febre hemorrágica epidêmica, na China; febre hemorrágica coreana, na Coreia; Nefropatia

Epidêmica, na Escandinávia; nefrite epidêmica ou febre hemorrágica epidêmica ou nefrite dos Balcãs, na Europa; e febre hemorrágica epidêmica, no Japão (BRASIL, 2013).

No geral, a FHSR apresenta sinais de trombocitopenia, diátese hemorrágica e insuficiência renal (VOGEL et al., 2007). A princípio, após fase inicial e febril inespecífica, além de sintomas oculares e eventos hemorrágicos, os pacientes apresentam derrame vascular em virtude da trombocitopenia e choque ocasional (10 a 15% dos casos), adentrando em fase hipotensiva. A fase seguinte denominada oligúrica é determinante na evolução do indivíduo, pois há grande risco de ocorrência de hipertensão, edema pulmonar e insuficiência renal, sendo essas complicações as principais responsáveis por aproximadamente 50% dos casos fatais por FHSR. Posteriormente a fase diurética subsequente, procede-se a convalescença (LEE et al., 1979; NIKLASSON et al., 1987; MUSTONEN et al., 1998; LUNDKVIST et al., 1998; MANIGOLD & VIAL, 2014).

#### 3.4.2 Síndrome Cardiopulmonar por *Hantavírus* (SCPH)

No “Novo Mundo”, o primeiro caso de *Hantavírus* ocorreu no continente americano entre os índios navajos da região dos Quatro Cantos (estados do Novo México, Utah, Arizona e Colorado) no sudoeste dos Estados Unidos (EUA) na primavera de 1993. A nova doença humana hantaviral manifestou sintomatologia respiratória grave e desencadeou, naquela ocasião, a síndrome cardiopulmonar. Esse misterioso surto, semelhante clinicamente a Síndrome Desconforto Respiratório Adulto, estimulou uma série de investigações virológicas e sorológicas que sugeriram uma enfermidade de curso rápido com alta letalidade, aproximadamente 75%. Esse vírus foi inicialmente denominado vírus dos *Quatro Cantos*, em seguida, vírus *Muerto Canyon*, até finalmente vírus *Sin Nombre* (SNV) (HUGHES et al., 1993; NICHOL et al., 1993; NOLTE et al., 1995), isolado e identificado em roedores predominantes na área, o *Peromyscus maniculatus* (CHILDS et al., 1994).

Assim como para FHRS, os casos de SCPH manifestam inicialmente as mesmas características febris inespecíficas, trombocitopenia e leucocitose, contudo, apresentam, por conseguinte, insuficiência respiratória de etiologia desconhecida e podem evoluir para quadros pulmonares fatais (WILLEMANN & OLIVEIRA, 2014). A severidade da fase cardiopulmonar ocorre após 7 dias do estágio prodrômico e é caracterizada pelo início de tosse seca, todavia, em alguns casos, pode ser produtiva, acompanhada por taquicardia, taquidispneia, hipoxemia, edema pulmonar não-cardiogênico, hipotensão e colapso circulatório (FERREIRA et al., 2000.; BRASIL, 2013).

Há uma estimativa de 300 casos de SCPH por ano nas Américas (NSOESIE et al., 2014), com cerca de 4.000 reportados desde 1993 (FIGUEIREDO et al., 2014) e com taxas de mortalidade para SCPH em torno de 50% (KRUGER et al., 2015). No entanto, essa taxa difere por cepa do vírus (JONSSON et al. 2010). Uma forma de atenuar esses números é por meio de incentivo a programas nacionais e financiamentos de amparo à pesquisa, tendo como modelo o ocorrido no Chile, levando a uma prevenção mais definida, diagnóstico mais rápido e intervenção otimizada e, assim, reduzindo o índice de mortalidade de 60% para cerca de 30% entre os aproximadamente 60 casos de SCPH por ano (MANIGOLD & VIAL, 2014).

Desde o surto nos EUA, um número crescente de países americanos vem descrevendo surtos e novos *Hantavírus*, bem como roedores-reservatório. No Brasil, há um considerável progresso nos números de estudos contínuos e bem-sucedidos acerca da SCPH sob aspectos epidemiológicos, clínicos e fisiopatológicos (FERREIRA et al., 2000; PINCELLI et al., 2003; WILLEMANN & OLIVEIRA, 2014; FIGUEIREDO et al., 2014) e desenvolvimento de métodos diagnósticos, como testes sorológicos de ELISA (RABONI et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2008, 2009).

### 3.5 Transmissão e fatores epidemiológicos

Os principais reservatórios do vírus são das ordens: Rodentia (roedores), Soricomorpha (mussaranhos e toupeiras) e Chiroptera (morcegos) (GUO et al., 2013). Todavia, apenas os Rodentia são capazes de transmitir os vírus, em virtude da sua habilidade de adaptação ecológica e fisiológica aos diversos biomas distribuídos pelo mundo (OLIVEIRA et al., 2014).

A transmissão da doença hantavirose, em ambas as síndromes clínicas, ocorre sobretudo por meio da inalação de aerossóis ou partículas virais provenientes das excretas secas de fezes, urina e saliva de roedores infectados pelo vírus (Figura 3). Outras formas também foram abordadas, porém pouco frequentes, como a percutânea, mordida do animal infectado e o contato do vírus com as mucosas (OPS, 1999; PINTO JUNIOR et al., 2014).

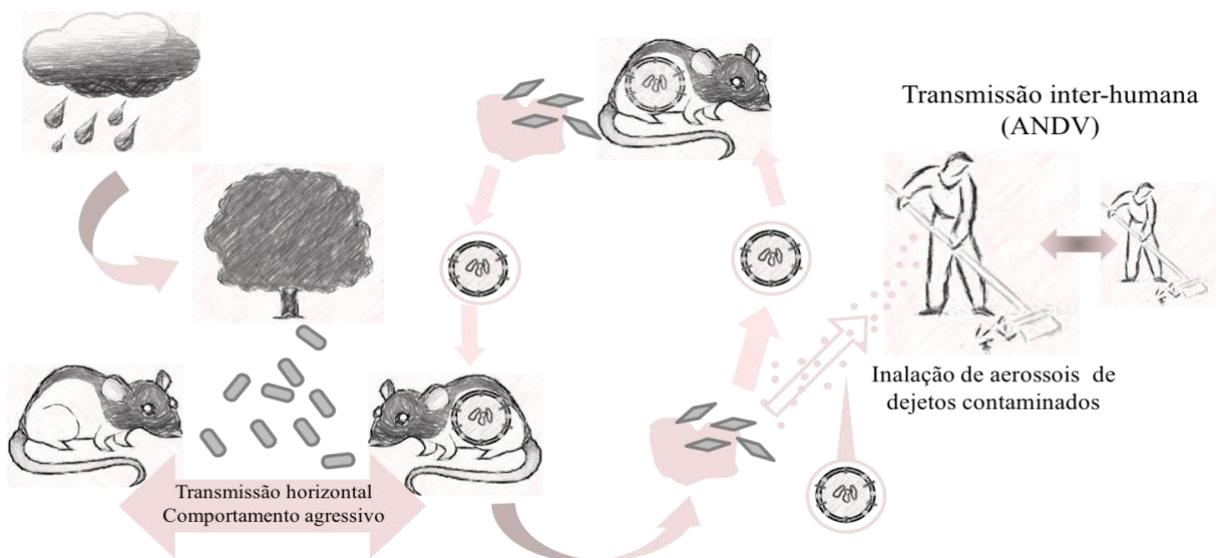


Figura 3. Ciclo de transmissão do *Hantavírus*. Desde a disponibilidade de alimentos pela chuva à inalação de aerossóis de secreções infectadas. (Fonte: Adaptado de MACHADO, 2007)

Outra forma de transmissão de grande importância epidemiológica foi descrita em 1996 na Argentina, no decorrer do surto de hantavirose associado ao vírus *Andes* (ANDV). Dois médicos desenvolveram a SCPH sem visitar tal área endêmica, no entanto, entraram em contato com o microrganismo durante o atendimento a um dos pacientes proveniente do surto. Com isso, pôde-se abordar a probabilidade de transmissão inter-humana por *Hantavírus* (ENRÍA et al., 1996; WELLS et al., 1997; PADULA et al., 1998).

Por conseguinte, um estudo similar decorrente de uma mesma ocasião foi realizado no Chile em 1997 que, embora inconclusivo, sugeriu-se esse tipo de transmissão em grupos de casos por contato domiciliar (GALENO et al., 2002). Mais recentemente, a transmissão domiciliar e nosocomial por ANDV foi evidenciada e confirmada no sul do Chile (MARTINEZ-VALDEBENITO et al., 2014).

No Brasil, os determinantes ambientais envolvidos no processo de transmissão não são totalmente compreendidos. Entretanto atividades relacionadas a dispersão de aerossóis ou poeira, tais como limpeza, remoção ou destruição de grãos armazenados em solos, ou ocasiões que estreitam o contato entre humanos e roedores-hospedeiros, são considerados grandes fatores de risco para adquirir a doença (NUNES et al., 2011).

A tríade epidemiológica da infecção por *Hantavírus* sugere-se ser formada pela intercomunicação de três elementos fundamentais para transmissão viral: reservatórios (roedores, morcegos e insetívoros), hospedeiro acidental (homem) e o ambiente.

Em geral, cada um desses três elementos influencia diretamente na incidência de ocorrência de casos e na distribuição e propagação viral mediante inúmeros fatores de transmissibilidade (ENGELTHALER et al., 1999; JONSSON et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013; ZEIER et al., 2005):

a) Roedores: comportamento das espécies, crescimento e adensamento populacional, adaptação às áreas degradadas, competição inter e intra espécie por alimento, reprodução, replicação e eliminação do vírus, presença de predadores;

b) Ambiente de ocorrência do reservatório: disponibilidade de alimentos, regime de águas, flutuações climáticas sazonais, fenômenos climáticos atmosférico-oceânicos;

c) Hospedeiro Acidental: atividades agrícolas, desmatamento, degradação de biomas preservados, colonização, atividades de lazer em áreas de ocorrência do reservatório roedor.

Globalmente, os principais fatores que afetam a sobrevivência de *Hantavírus* fora do hospedeiro roedor são temperatura, umidade, exposição à radiação luz ultravioleta e à luz solar, e o teor de matéria orgânica de fluido contaminado. Condições ideais para a sobrevivência no ambiente pode variar entre os diferentes Hantavírus e, assim, explicar a dinâmica do diferencial de infecção em roedores e seres humanos (MANIGOLD & VIAL, 2014).

Nos últimos anos, casos foram relatados nas periferias de cidades de países de baixa e média renda, onde ocorrem, principalmente, a exposição peridoméstica, por meio do crescimento desordenado em assentamentos humanos com práticas de desflorestamento em áreas rurais próximas ao habitat natural dos roedores, promovendo a invasão e a conexão com esses hospedeiros (NUNES et al., 2011). Atividades de lazer, como caça e pesca, também permitem a transmissibilidade (NSOESIE et al., 2014). Os roedores, por outro lado, podem entrar em habitações humanas abandonadas, por exemplo, domicílios de verão, em busca de alimento e deixar fezes, urina e saliva contaminadas, permitindo a exposição aos seres humanos após o seu regresso (MANIGOLD & VIAL, 2014).

Há outro fator intrigante quanto à disseminação de infecções predominantes e específicas de uma região para outros locais não-impactados ou sem ocorrência de determinado sorotipo. Esse fato pode estar atrelado ao fluxo demasiado de turistas, soldados e/ou imigrantes (PRASAD, 2010).

Muitos fatores ou combinações de fatores que contribuem para a emergência de doenças incluem mudanças ecológicas, tais como as causadas por atividades de humanos ou a anomalias no clima; mudanças demográficas e alterações comportamentais, como viagens, tecnologia e indústria; e mudança e repartição de medidas de saúde pública (CDC, 1994). As doenças infecciosas emergentes também são atribuídas ao crescimento e envelhecimento da população, à pobreza e desnutrição, à poluição ambiental, à infraestrutura inadequada, à falta de

saneamento e abastecimento de água, ao aquecimento global e a adaptação e desenvolvimento de resistência antimicrobiana / inseticida (MORSE, 1995).

O aumento na prevalência de todos esses fatores, juntamente com o curso da evolução das variantes microbianas e seleção para resistência aos medicamentos, sugere que infecções tendem à continuidade de eclosões e, por isso, há uma necessidade enfática no controle efetivo, além do desenvolvimento de novos instrumentos de vigilância avançada, testes de diagnóstico, vacinas e terapias (PRASAD, 2010).

### 3.6 Epidemiologia

#### 3.6.1 Mundo

A distribuição desses vírus, em muitos casos, é específica, segundo a constatação da relação direta entre uma espécie de *Hantavírus* e seu hospedeiro-específico. Cada espécie encontra-se em um único roedor hospedeiro, em contrapartida, um único roedor pode ser reservatório para mais de um tipo de *Hantavírus* com características genômicas distintas ou não (SILVA-VERGARA et al., 2002). Assim, pode-se correlacionar a localização geográfica das cepas com o habitat dos seus respectivos roedores (JONSSON, et al., 2010; YOSHIMATSU & ARIKAWA, 2014; MANIGOLD & VIAL, 2014).

Em geral, as espécies de *Hantavírus* que infectam roedores estão distribuídas em (PLYUSNIN, 2002; ZHANG et al, 2010; YOSHIMATSU & ARIKAWA, 2014):

- a) Família Muridae: Subfamílias Murinae e Arvicolinae, na Europa e Ásia;
- b) Família Cricetidae: Subfamílias Sigmondontinae e Neotominae, nas Américas.

Associados à subfamília de roedores Murinae, os principais agentes são os causadores das formas mais graves de FHSR (Tabela 1). Enquanto a subfamília Arvicolinae, distribuída pela Eurásia, tem como principal representante patogênico o vírus *Puumala* (PUUV), causador da forma mais branda de FHSR, que infecta a ratazana de banco *Myodes glareolus* (BRUMMER-KORVENKONTIO et al., 1980).

Vírus	Roedor	Local de Identificação	Ano	Referência
Hantaan (HTNV)	<i>Apodemus agrarius</i>	Coreia	1976	LEE et al., 1978, 1989
Seoul (SEOV)	Ratos urbanos <i>Rattus norvegicus</i> e <i>R. rattus</i>	Coreia	1982	LEE et al., 1982
Dobrava-Belgrade (DOBV)	Camundongos de pescoço amarelo ( <i>Apodemus flavicollis</i> )	Regiões Balcãs: Eslovénia e Sérvia	1992	AVSIC et al., 1992; GLIGIC et al., 1992
	<i>Apodemus agrarius</i>	Europa	2001	SIBOLD et al., 2001

Tabela 1. Principais *Hantavírus* patogênicos causadores de FHSR grave.

Outros agentes causadores de FHSR são: vírus *Saaremaa* (SAAV) – *Apodemus agrarius*; vírus *Sangassou* (SANGV) – *Hylomyscus simus*; vírus *Tula* (TULV) – *Microtus arvalis* e *M. rossiaemeridionalis*; vírus *Thottapalayam* (TPMV) – *Suncus murinus* (LEE et al, 2014). O vírus *Thailand* (THAIV), carregado pelo *Bandicota indica* é suspeito de ser patogênico em humanos na Ásia (SUPUTTHAMONGKOL et al., 2005; PATTAMADILOK et al., 2006).

Com uma taxa de letalidade geral em torno de 12% (MANIGOLD & VIAL, 2014), a cepa causadora define o nível da gravidade e determina a taxa de letalidade de FHSR, com HTNV atingindo cerca de 5%, DOBV a 10% (NICHOL, 2001; VAHERI et al., 2013), SEOV podendo atingir 2% em casos fatais, enquanto a NE induzida por PUUV leva à morte em 0,08% a 0,4% dos pacientes (VAHERI et al., 2013).

Os números atuais em relação ao número de casos no mundo giram em torno de 150.000 a 200.000 casos de doença por *Hantavírus* por ano, dos quais 70% a 90% correspondem a casos FHSR na China. Ressalta-se que esse país é a região mais endêmica no mundo para hantavirose, estimando a soroprevalência na população cerca de 5% (MANIGOLD & VIAL, 2014).

### 3.6.2 Américas

Estudos precoces foram realizados, antes mesmo do surto das Nações Unidas, revelando a disseminação de infecções por *Hantavírus* na América do Sul desde a década de 80. Inquéritos sorológicos foram desenvolvidos em ratos urbanos (*Rattus norvegicus*) em diferentes cidades e

foi detectado positividade em amostras de soro de ratos capturados nas cidades de Belém, São Paulo, Recife e Olinda, no Brasil, e em Buenos Aires, na Argentina. O vírus isolado de um dos ratos provenientes da captura em Belém apresentou similaridade antigênica com o SEOV, enfatizando a dissipação viral (LeDUC et al., 1985, 1986).

A primeira suspeita de *Hantavírus* no “Novo Mundo” foi observada no norte dos EUA, na cidade de Maryland, em 1982, em ratazanas silvestres *Microtus pennsylvanicus* por meio da presença de isolados do vírus *Prospect Hill* no soro do animal. Essa forma pôde infectar humanos, entretanto, sem desencadear doença (FRANKO et al., 1983; YANAGIHARA et al., 1984).

Subsequentemente, em 1993 uma síndrome respiratória de causa desconhecida surgiu no continente americano. Primeiramente, na América do Norte reportando um surto nos EUA com reconhecimento do SNV e seu respectivo reservatório (KSIAZEK et al, 1995). Em seguida, na América do Sul, os *Hantavírus* com similaridade genética ao SNV começaram a ser isolados e identificados.

Em março e abril de 1995, um surto de estresse respiratório agudo atingiu três pessoas de uma área rural, perto de El Bolsón, na Argentina, das quais duas foram a óbito. Inicialmente, a investigação sorológica resultou em positividade para anticorpos IgM e IgG reagindo contra o SNV, em seguida, a caracterização genética levou a identificação de um novo *Hantavírus*, o vírus *Andes* (ANDV) (LÓPEZ et al., 1996), cujo roedor-hospedeiro é *Oligoryzomys longicaudatus* (LEVIS et al., 1998)

Desde 1993, cerca de 4.000 casos de SCPH têm sido relatados no continente americano desencadeados por aproximadamente 30 cepas de *Hantavírus* (FIGUEIREDO et al., 2014). Na América do Norte, o agente influente causador dessa síndrome é o SNV, enquanto o ANDV é o de maior relevância clínica na região sulamericana (KRUGER et al., 2015). Na América Central, o patógeno predominante é o vírus *Choclo* (CHOV), abrigado pelo roedor

*Oligoryzomys fulvescens*, residente no Panamá (VINCENT et al., 2000). Outros Hantavírus patogênicos e seus respectivos roedores-reservatórios estão listados na tabela 2.

Região/Vírus	Roedor-reservatórios	Local de Identificação	Referência
<b>América do Norte</b>			
Bayou (BAYV)	<i>Oryzomys palustris</i>	EUA (Luisiana)	MORZUNOV et al., 1995
Black Creek Canal (BCCV)	<i>Sigmodon hispidus</i>	EUA (Flórida)	RAVKOV et al., 1995
New York (NYV)	<i>Peromyscus leucopus</i>	EUA (Nova Iorque)	HJELLE et al., 1995
<b>América do Sul</b>			
Andes (ANDV)	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	Chile	LÓPEZ et al., 1997
Laguna-Negra (LANV)	<i>Calomys laucha, C. callosus</i>	Argentina, Bolívia, Paraguai	WILLIAMS et al., 1997 JOHNSON et al., 1997
Rio Marmoré (RIOMV)	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Bolívia e Peru	HJELLE et al., 1996
Bermejo (BMJV)	<i>Oligoryzomys chocoensis</i>	Argentina	LEVIS et al., 1998
Oran (ORNV)	<i>O. longicaudatus</i>	Argentina	LEVIS et al., 1998
Lechiganas (LECV)	<i>Oligoryzomys flavescen</i>	Argentina	LEVIS et al., 1998
Maciel (MACV)	<i>Bolomys obscurus</i>	Argentina	LEVIS et al., 1998
Juquitiba (JUQV)	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Brasil (SP)	IVERSSON et al., 1995
Araraquara (ARAV)	<i>Bolomys lasiurus</i>	Brasil (SP)	JOHNSON et al., 1999
Castelo dos Sonhos (CASV)	<i>Oligoryzomys moojeni</i>	Brasil (MT)	JOHNSON et al., 1999
Anajatuba (ANJV)	<i>Oligoryzomys fornesi</i>	Brasil (MA)	MENDES et al., 2001
Laguna-Negra semelhante (LANV-like)	<i>Calomys callosus</i>	Brasil (MT)	RABONI et al., 2009

Tabela 2. Principais *Hantavírus* patogênicos causadores de SCPH nas Américas.

Nos dias atuais, diversas regiões americanas albergam muitas outras espécies de *Hantavírus* reportadas, como México (7 espécies, inclusive SNV), Venezuela (2 espécies), Honduras (1 espécie), Costa Rica (1 espécie), Colômbia (1 espécie), Guiana Francesa (RIOMV) e Peru (RIOMV e SEOV), entre outros (MONTROYA-RUIZ et al., 2014).

Dados recentes a cerca de soroprevalência demonstram valores de 1% na Região dos Quatro Cantos nos EUA, menos de 0,1% na população geral do país, 1,9 a 7,5% em regiões endêmicas no Chile e 15% a 60% em áreas rurais do Panamá, Paraguai e Argentina sendo as

taxas de soropositividade mais altas relatadas. Quanto à severidade e taxas de letalidade por SCPH há uma oscilação considerável. Para os Hantavírus de maior relevância do “Novo Mundo”, como SNV, ANDV, ARAV e JUQV, as taxas de casos fatais alternam entre 25% e 40%, enquanto o LANV atinge 15% e CHOV atinge 10% (MANIGOLD & VIAL, 2014).

### 3.6.3 Brasil

Em 1993, simultaneamente ao surto ocorrido nos EUA, os primeiros casos no Brasil estavam sendo confirmados no município de Jujutiba, região do Vale Ribeira, estado de São Paulo, quando três irmãos jovens e saudáveis, recém-chegados na Serra do Mar, com histórico recente de exploração da Mata Atlântica, desenvolveram uma doença em curto intervalo de tempo e manifestaram quadros graves de insuficiência respiratória aguda e choque, dos quais dois foram à óbito (SILVA et al, 1997). Apenas anos depois, com análises filogenéticas e moleculares, determinaram-se a nova linhagem hantaviral, *Jujutiba* (JUQV), e seu roedor-reservatório, *Oligoryzomys nigripes* (JOHNSON et al., 1999; SUZUKI et al., 2004).

Entre 1995 e 1996, foram descritos e diagnosticados novos casos de SCPH, sendo um proveniente da região do Vilarajo de Castelo dos Sonhos, no estado do Mato Grosso, e outros dois, novamente em São Paulo, na parte sudoeste do estado, nas cidades de Araraquara e Franca. Em 1999, Johnson e outros pesquisadores realizaram estudos filogenéticos para estabelecer as novas linhagens virais com base nos locais de origem, e assim determinaram-se os novos agentes: *Castelo dos Sonhos* (CASV) e *Araraquara* (ARAV).

Desde então, o número de casos notificados dessa doença avançou progressivamente no País. Na descrição desses eventos foi ratificado a relação com ocasiões climáticas e atividades ocupacionais ou de lazer que envolvia contato com floresta e desmatamento e, conseqüentemente, maior proximidade a roedores silvestres da subfamília Sigmondontinae, os quais são predominantes em habitações rurais e áreas suburbanas nas diversas regiões brasileiras.

Outras variantes virais de Hantavírus foram identificadas e tornaram-se prevalentes no país, como: ANJV, encontrado em roedores silvestres da Floresta Amazônica e regiões inundadas (MENDES et al., 2001); LANV-*like*, residente em roedores silvestres do cerrado, pastagens e Floresta Amazônica (LOPES et al., 2014; RABONI et al., 2009). Os vírus JUQV ocorrem em roedores silvestres da região da Mata Atlântica; ARAV, naqueles que vivem nos biomas cerrado e caatinga (vegetação típica brasileira); e CASV, presente em roedores do cerrado e Floresta Amazônica (WILLEMANN & OLIVEIRA, 2014)

Embora o primeiro e principal surto de SCPH reconhecido no mundo tenha ocorrido nos EUA, atualmente, o maior número de casos nas Américas é de responsabilidade da América do Sul, superando a do Norte. Progressão essa desencadeada, principalmente, por Argentina, Chile e Brasil (FIGUEIREDO et al., 2003).

No Brasil, os casos de SCPH vêm sendo diagnosticados desde 1993, conforme tabela 3, predominantemente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, sendo os responsáveis por cerca de 88% dos casos no Brasil e, a região Sul, majoritária com a maior taxa de ocorrências de 35,3%. A maioria das infecções de 1993 a 2016 ocorreram nos estados de Minas Gerais (15,99%), Santa Catarina (15,94%), Mato Grosso (15,45%), Paraná (13,27%) e São Paulo (11,14%), onde a ocupação comum dos habitantes integram atividades agropecuárias pertinentes a dois tipos de ecossistemas naturais: cerrado e da Mata Atlântica (SUZUKI et al., 2004).

De acordo com o Ministério da Saúde, até setembro de 2016, foram notificados 2.019 casos de hantavirose no Brasil, com letalidade de 39,87% (805/2.019). Observou-se que o estado de São Paulo vem se demonstrando com a maior taxa de letalidade atualmente (52,88%), inclusive bem acima da média nacional. Pesquisadores afirmam que dentro de cada região, a taxa de letalidade pode variar de 33% a 100% (PINTO JUNIOR et al., 2014). O maior pico anual, até então, ocorreu em 2006, com 191 casos notificados e 63 óbitos. Contudo, acredita-se que o número real de casos por ano é ainda maior que o notificado, tendo como principais razões

o diagnóstico equivocado e erroneamente realizado, devido ao perfil clínico semelhante a outras viroses, além das ocorrências não-notificadas ou subnotificadas.

Região/UF	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	TOTAL	
Acre																									-	
Amapá																										-
Amazonas												3	1						2							6
Rondônia												1			1	1					2					5
Roraima																										-
Pará			1					1	1		2	2	9	15	9	17	15	4	11	4	4	3	3	2		103
Tocantins																										-
<b>NORTE</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>4</b>	<b>13</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>114</b>	
Alagoas																										-
Bahia				1																						1
Ceará																										-
Maranhão								1	2		4			2		1	1				1					12
Paraíba																										-
Pernambuco																										-
Piauí																										-
Rio Grande do Norte							1		1																	2
Sergipe																										-
<b>NORDESTE</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>-</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>15</b>
Brasília (DF)												27	16	5	7	3	9	13	7	1	3	2	2	2	2	97
Mato Grosso							3	2	10	12	5	9	11	49	29	22	26	48	8	17	23	16	18	4		312
Mato Grosso do Sul																				1			1	1		3
Goiás								1			2	9	5	5	6	10	13	12	6	7	10	1	11	10		108
<b>CENTRO-OESTE</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>7</b>	<b>45</b>	<b>32</b>	<b>59</b>	<b>42</b>	<b>35</b>	<b>48</b>	<b>73</b>	<b>21</b>	<b>26</b>	<b>36</b>	<b>19</b>	<b>32</b>	<b>17</b>	<b>520</b>	
Espírito Santo																										-
Minas Gerais					2	3	9	5	14	21	39	39	34	25	19	24	23	11	10	14	11	10	10	10		323
Rio de Janeiro																										-
São Paulo	3			2	5	10	1	8	15	17	10	11	9	20	16	10	24	19	12	10	11	8	4			225
<b>SUDESTE</b>	<b>3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>29</b>	<b>38</b>	<b>49</b>	<b>50</b>	<b>43</b>	<b>45</b>	<b>35</b>	<b>34</b>	<b>47</b>	<b>30</b>	<b>22</b>	<b>24</b>	<b>22</b>	<b>18</b>	<b>14</b>	<b>548</b>	
Paraná							7	24	30	15	14	10	48	10	6	10	10	14	10	9	15	7	20	9		268
Rio G. do Sul					4	4	10	6	7	2	8	3	11	4	9	10	8	9	6	7	4	7	4			123
Santa Catarina						1	5	16	11	16	41	23	50	18	17	12	19	16	18	22	14	20	3			322
<b>SUL</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>39</b>	<b>52</b>	<b>33</b>	<b>32</b>	<b>59</b>	<b>74</b>	<b>71</b>	<b>28</b>	<b>36</b>	<b>32</b>	<b>41</b>	<b>35</b>	<b>33</b>	<b>44</b>	<b>25</b>	<b>47</b>	<b>16</b>	<b>713</b>		
Ignorado	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	4	-	1	7	3	4	8	18	15	20	14	9	4		109
<b>BRASIL</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>29</b>	<b>55</b>	<b>79</b>	<b>74</b>	<b>84</b>	<b>163</b>	<b>166</b>	<b>191</b>	<b>132</b>	<b>128</b>	<b>134</b>	<b>173</b>	<b>117</b>	<b>100</b>	<b>131</b>	<b>83</b>	<b>109</b>	<b>53</b>	<b>2019</b>	

Tabela 3. Casos de hantavirose no Brasil, de 1993 a 2016. Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde (SINAN/SVS/MS).

### 3.6.4 Região Amazônica

A Amazônia Legal compreende a maior biodiversidade em uma floresta tropical no mundo e está contida em países da América da Sul, como Peru, Colômbia, Venezuela, Equador, Bolívia, Guiana, Suriname, Guiana Francesa e Brasil, esse último corresponde a 60% da sua totalidade. Dentre esses, Suriname, Guiana e Equador ainda não apresentaram ocorrência de hantavirose (FIGUEIREDO et al., 2014; MONTOYA-RUIZ et al., 2014).

Dos estados brasileiros que compõem a Região Amazônica, foram registrados casos no norte do Brasil, com Amazonas, Pará e Rondônia, além de Maranhão e Mato Grosso no período de 1993 a 2016 (SANTOS et al., 2012; SINAN/SVS/MS), conforme tabela anterior. Ressalta-se que os roedores e as variantes virais encontradas nessa Região são: *Calomys callidus* – LANV-like, *Oligoryzomys moojeni* – CASV, *Oligoryzomys microtis* - RIOMV, *Oligoryzomys fornesi* – ANJV e o *Holochilus sciureus* – vírus *Rio Mearim* (NUNES et al., 2011; PINTO JUNIOR et al., 2014).

Estudos recentes revelam que mais de 50% dos casos ocorreram em indivíduos com ocupações voltadas à agricultura, pecuária, extrativismo e extração e produção de madeiras, portanto, com grande probabilidade de a zona rural ser o principal local de transmissão. A presença de solos abundantes em matéria orgânica vegetal, característica da Amazônia, propicia intensos processos de uso e ocupação, principalmente no Pará e Mato Grosso, onde ocorrem o maior número de registros. Esse fato motiva, conseqüentemente, uma transição humana descontrolada para áreas rurais em busca de exploração de recursos naturais, causando um desequilíbrio ambiental generalizado. Os fatores sazonais são de relevância considerável para dinâmica de hantavirose na Amazônia Legal, sem excluir a ecologia dos roedores (DONALÍSIO et al., 2008; SANTOS et al., 2012)

### 3.6.5 Amazonas

A primeira referência de Hantavírus no Brasil revela um estudo sorológico realizado no estado do Amazonas em agosto de 1991 com indivíduos residentes em Manaus. Motivado pela ocorrência de 7 óbitos por febre hemorrágica com etiologia desconhecida, procedeu-se o teste de imunofluorescência indireta (IFI) contra o HTNV, cuja soropositividade foi de 45,2% em amostras de soro de familiares e próximos desses pacientes e 54,3% em amostras de doadores de sangue (VASCONCELOS et al., 1992).

Em seguida, em julho de 2004, foram evidenciados os primeiros casos identificados e confirmados de hantavirose no estado, mais precisamente no município de Itacoatiara (baixo Rio Amazonas). Nesta ocasião, quatro agricultores jovens de uma mesma família, moradores de área rural, entraram em contato com roedores durante suas atividades e, posteriormente, apresentaram um quadro febril agudo. Desses, 3 foram diagnosticados laboratorialmente e o outro foi à óbito sem confirmação laboratorial. Neste relato, investigou-se 11 roedores capturados, sendo 9 da espécie *Oligoryzomys microtis*, e 4 deles sorologicamente positivos por ELISA para *Hantavírus* (ELKHOURY, et al., 2005; SANTOS et al., 2006). Futuramente, um estudo confirmou a identificação da variante RIOMV-3 para essas 4 amostras soropositivas (FIRTH et al., 2012).

Em 2005, um caso fatal de SCPH foi relatado no município de Maués (TEIXEIRA et al., 2006; GIMAQUE et al., 2012) e, em 2011, ocorreu outro caso fatal reportado no município do Careiro da Várzea, que teve sua amostra analisada e identificada pela variante RIOMV (OLIVEIRA et al., 2014).

Ressalta-se que houve casos relatados em estudos epidemiológicos que não foram reconhecidos pelo Ministério da Saúde, no SINAN NET. Um ocorreu em julho de 2007, no município de Itacoatiara, porém o paciente realizou passagem pelo estado de Goiás e assim não se pode confirmar o real local de infecção (GIMAQUE et al., 2012). Outros 3 casos – 1 em

2008 e 2 em 2009, sendo 1 identificado como CASV – ocorreram, contudo sem registros de suas localidades e outras informações adicionais (FIRTH et al., 2012).

Mais recentemente, pesquisadores elaboraram um estudo de prevalência em soros de humanos residentes em municípios do estado do Amazonas e reportaram valores de 0,2%, 0,4%, 0,8% e 0,9% em Itacoatiara, Careiro Castanho, Atalaia do Norte e Lábrea, respectivamente (GIMAQUE et al., 2012).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Delineamento e fluxograma experimental

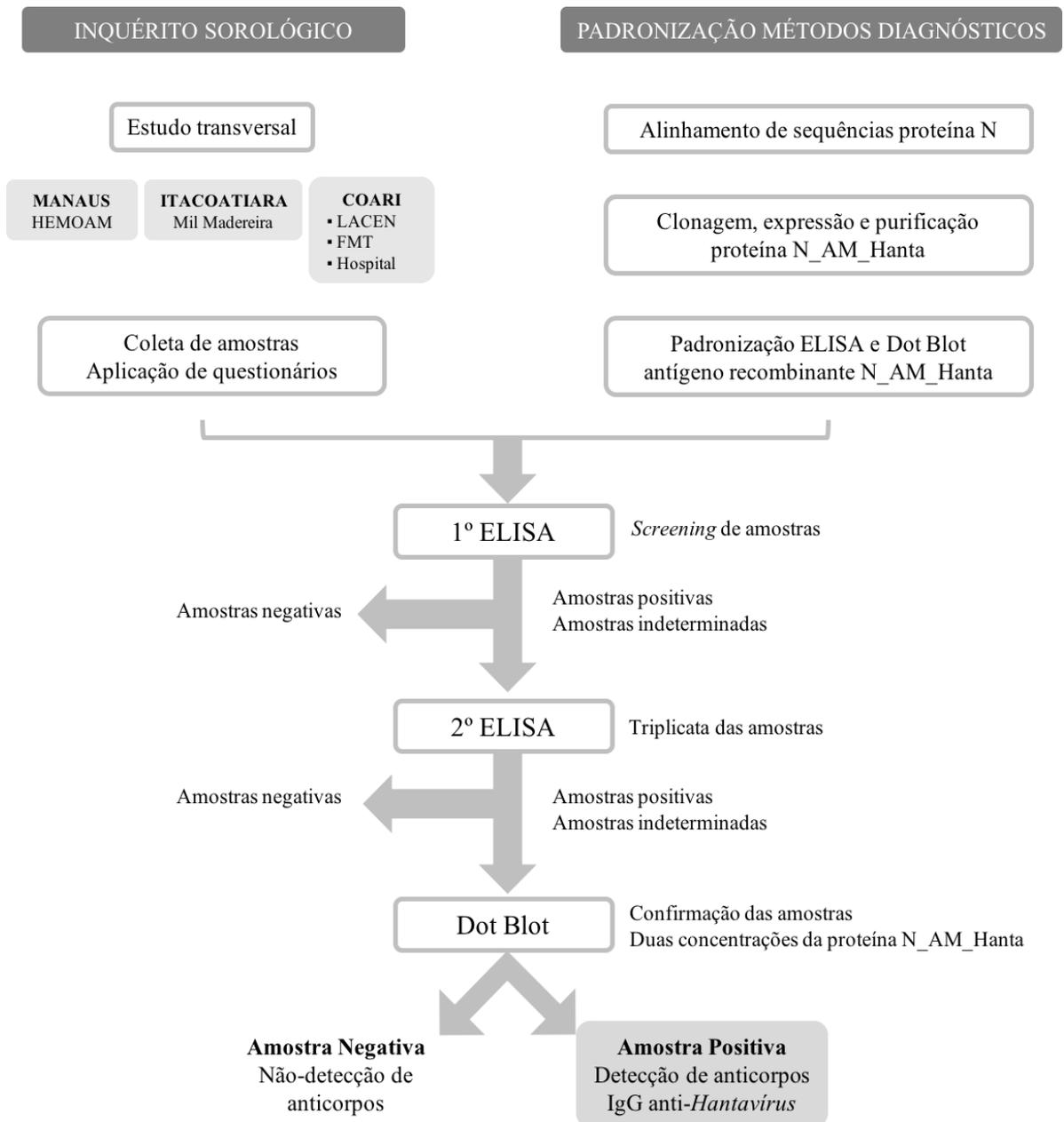


Figura 4. Delineamento e Fluxograma experimental do trabalho.

## 4.2 Estudo populacional

### 4.2.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo transversal. A amostragem foi calculada por meio de programa estatístico *online* OpenEpi. Utilizou-se os dados do contingente populacional proporcionado pelo Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) e Secretarias de Saúde dos municípios estudados, frequência de 50% (valor usado para frequências desconhecidas), limite de confiança de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), e, assim, determinando um  $n$  de 400 amostras por região.

A pesquisa contará com as populações residentes nos municípios de Manaus (3.1292° S, 60.0214° W) e regiões com localidade próxima à capital, como Coari (4.0850° S, 63.1408° W) e Itacoatiara (03°08'35" S, 58°26'39" W) (Figura 5).

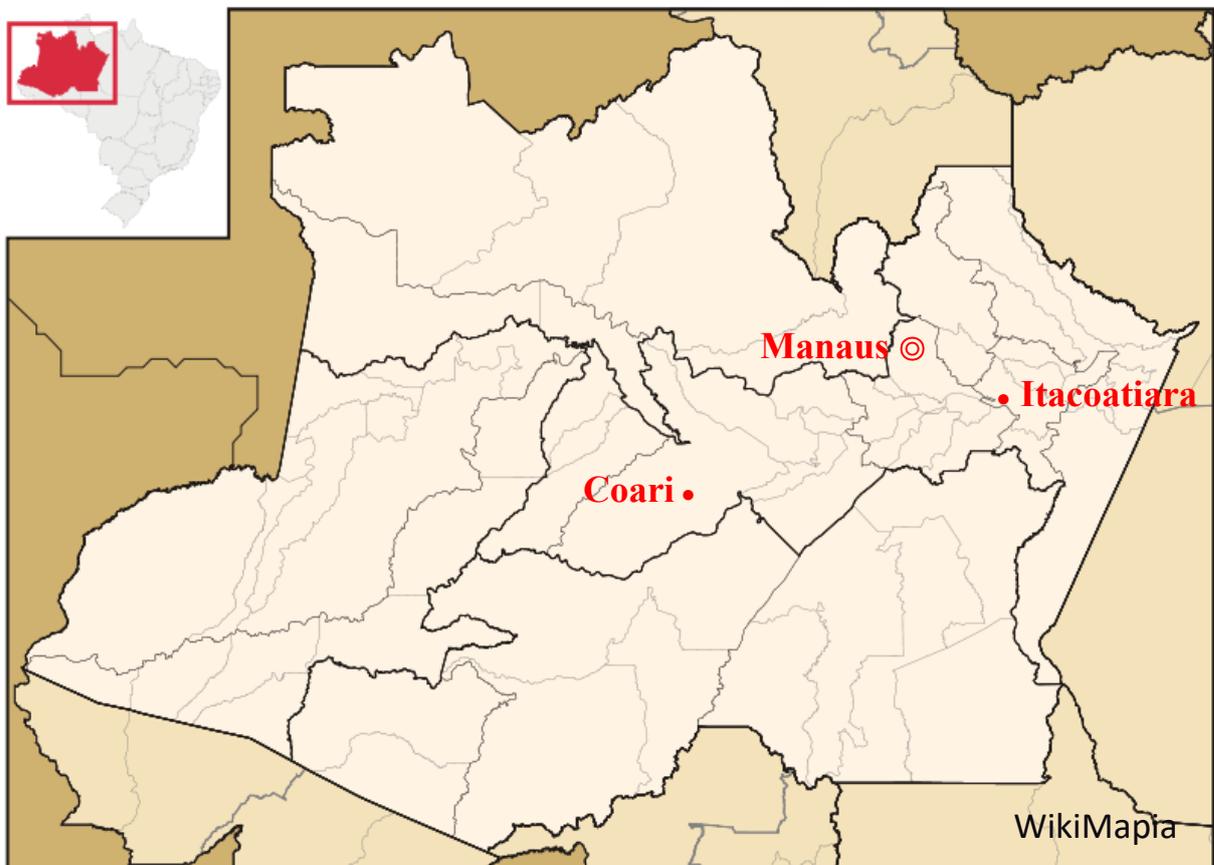


Figura 5. Representação geográfica dos locais de coletas.

#### 4.2.2 Descrição da população e coleta de material

A coleta das amostras foi realizada convenientemente, tendo como único critério de inclusão ter idade igual ou maior que 18 anos, e segue descrita na tabela abaixo.

Município	População	Amostras coletadas	Local de Coleta	Período de coleta
Manaus	Doadores de sangue	1054	HEMOAM	Outubro a dezembro de 2014
Coari	População geral	643	LACEN, Hospital e FMT	Maior de 2016
Itacoatiara	Trabalhadores rurais	65	Empresa Mil Madeireira	Outubro de 2015

Tabela 4. Informações sobre a coleta do trabalho. Município, população participante, quantidade de amostras coletadas, local e período de coleta.

Foram coletados 5 mililitros (mL) de sangue da veia com o uso de agulha e seringa descartáveis em tubos à vácuo com EDTA. As amostras foram centrifugadas de 2.000 a 3.000 rpm por 5 a 10 minutos. Tanto o sobrenadante (porção plasmática) quanto a porção celular foram separadas em *ependorfs* de 2 mL armazenadas a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores procedimentos.

#### 4.2.3 Aspectos éticos e inquérito sorológico

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas sob o nº de CAAE 19328313.7.0000.5020, nº do parecer 569.240 e CEP 522021 (anexo 1), para coleta de amostras em humanos.

Os participantes do estudo foram submetidos a um questionário epidemiológico (anexo 2) com dados sociais, demográficos, econômicos e investigativos que contribuiriam para melhor compreensão dos prováveis fatores associados à circulação do *Hantavírus* na região, com a devida assinatura do documento de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 3), permitindo e autorizando o uso da amostra para o desenvolvimento da pesquisa.

#### 4.3 Alinhamento e análise das sequências da nucleoproteína do *Hantavírus*

Foi realizado um levantamento das sequências do nucleocapsídeo, proveniente do segmento S, de espécies de *Hantavírus* identificadas na região e que estavam disponíveis no bando de dados *online* (*GenBank* e *Virus Pathogen Resource*). Foi utilizado para o alinhamento doze sequências de aminoácidos da nucleoproteína, dentre elas, sete cepas da espécie ANDV, pertencente ao clã *Andes* e prevalente na América do Sul, três cepas de CASV, do clã *Laguna Negra*, e duas de RIOMV, do clã *Rio Mamoré*, ambas espécies encontradas na Região Amazônica e publicadas em estudos prévios (FIRTH et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014). O alinhamento permitiu a obtenção de uma sequência de aminoácidos consenso, denominada N\_AM\_Hanta, por meio de ferramentas *online* de alinhamento múltiplo de sequências, como MUSCLE e MAFFT, bem como o software MEGA, versão 7.

#### 4.4 Análise filogenética

Neste estudo filogenético, utilizou-se a sequência da nucleoproteína obtida do alinhamento das 12 cepas envolvidas no trabalho em comparação a outras sequências nucleoproteicas de diversas espécies de *Hantavírus* disponíveis no banco de dados *online* (*GenBank*) para análise comparativa de distância e similaridade. Para isso, utilizou-se o programa MEGA (versão 7) e FigTree (versão 1.4.2).

#### 4.5 Desenho e otimização do fragmento da nucleoproteína recombinante N\_AM\_Hanta

Os aminoácidos da sequência gerada da proteína N\_AM\_Hanta foram substituídos e otimizados em códons preferenciais para expressão da proteína na hospedeira *Escherichia coli* (*E. coli*) por meio de ferramenta *online* (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) e edição manual.

Foram desenhados na sequência uma cauda de histidina, composto por 6 aminoácidos consecutivos de histidina (*His6x-tag*), e enterokinase, para auxiliar no processo de purificação da proteína, além dos sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *NdeI* na extremidade 5' do gene N e sítios de *NotI*, *BamHI* e *HindIII* na extremidade 3', conforme ilustrado na tabela 6.

<b>Desenhos e Sítios de restrição</b>	
<b>Sequência 5'→3'</b>	<p>GAATTCATATGGGTGCCCATCACCATCACCATCACGGTGCAGATGACGATGACAAA-</p> <p>SEQUÊNCIA CODIFICADORA PROTEÍNA N_AM_HANTA</p> <p>-GCGGCCGCAAGGATCCAAGCTT</p>
<b>Sítios de restrição</b>	

Tabela 5. Desenho do fragmento da proteína N\_AM\_Hanta, otimizada e com a cauda de histidina (*His6x-Tag*) e enterokinase e os sítios de restrição nas extremidades correspondentes.

#### 4.6 Síntese química do fragmento da nucleoproteína recombinante N\_AM\_Hanta

A sequência codificadora da proteína N\_AM\_Hanta foi sintetizada e clonada dentro do sítio de restrição *SmaI* do vetor de transferência pBluescript II SK (-) (pBSK), desprovido do múltiplo sítio de clonagem, conforme a Figura 6. Estes materiais foram fornecidos pela empresa GenOne Biotechnologies.

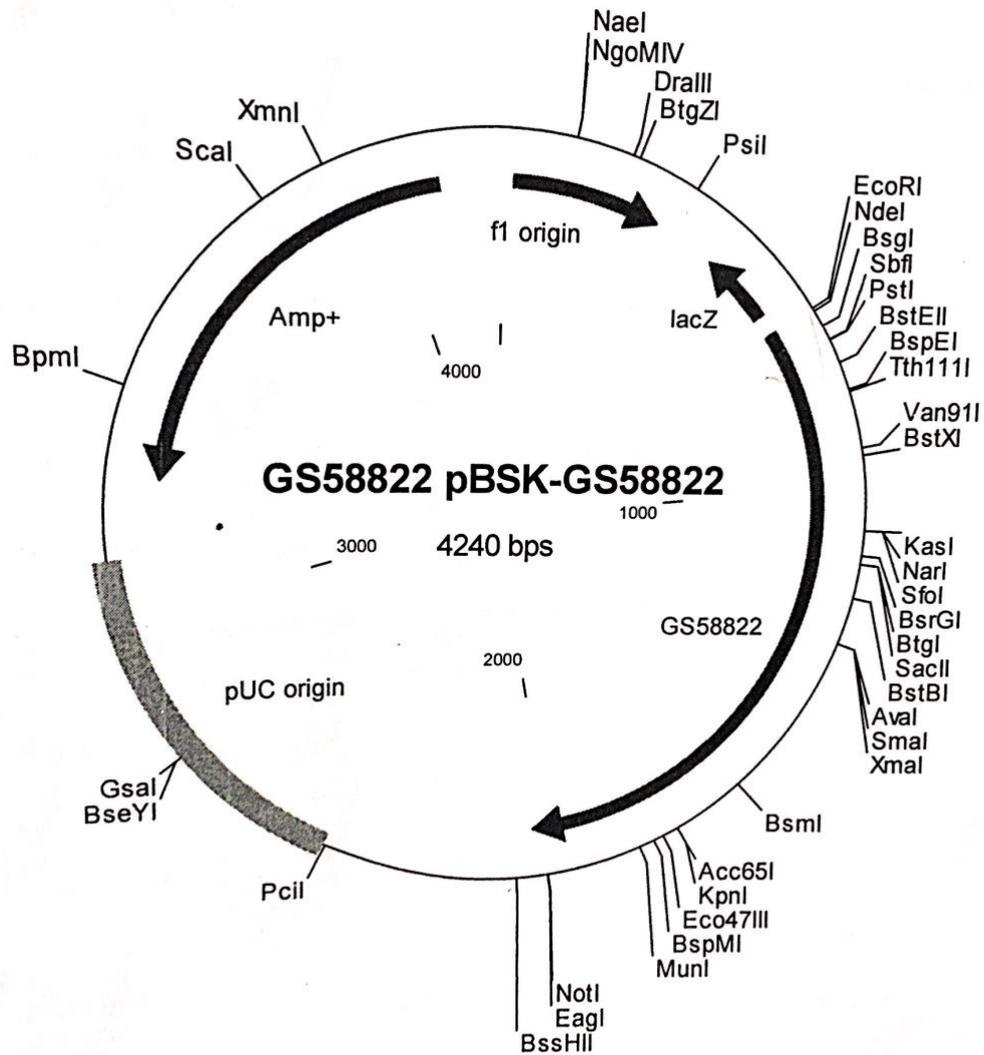


Figura 6. Representação esquemática do vetor comercial pBSK contendo o fragmento da proteína N\_AM\_Hanta desenhado para este trabalho e identificado como (GS58822), fornecido pela empresa GenOne Biotechnologies.

#### 4.7 Plasmídeo utilizado para expressão da proteína

O grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia de DNA/CAM/UFAM inseriu o gene da hipoxantina guanina fosforribosiltransferase (HGPRT) em um plasmídeo comercial, pGS-21a, produzido pela empresa GenScript, o qual é denominado por eles de pGSHP (pGS21a+HGPRT), conforme o mapa plasmidial apresentado na Figura 7. Este plasmídeo recombinante foi utilizado para a expressão da proteína N\_AM\_Hanta, por meio da retirada do gene HGPRT e inserção do gene da proteína de interesse.

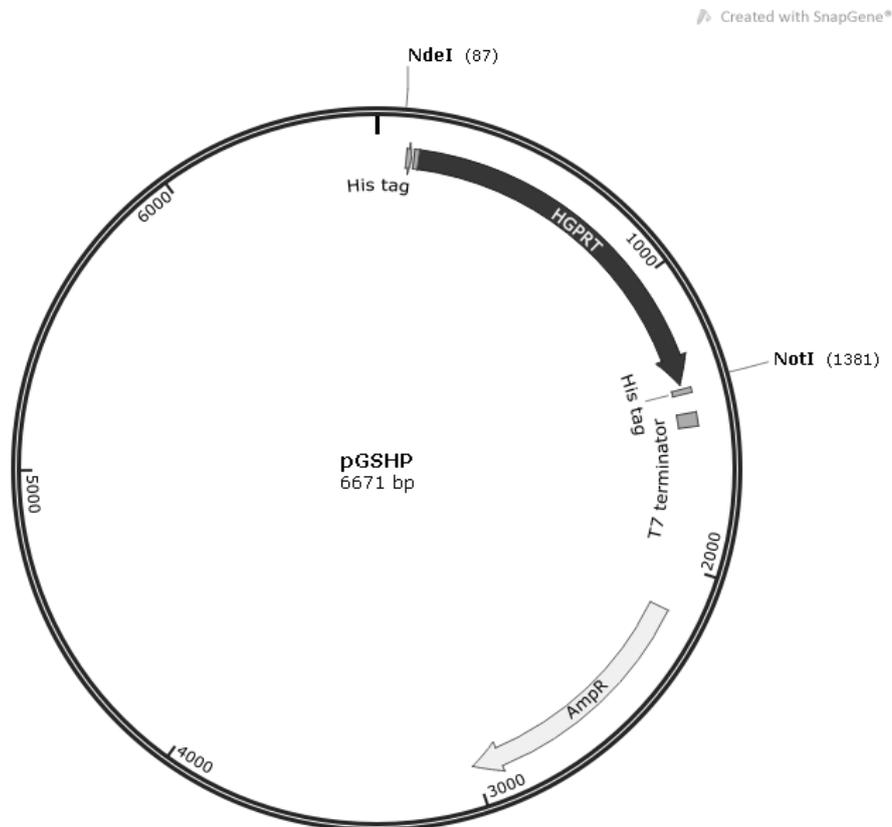


Figura 7. Representação esquemática do mapa físico do vetor de expressão pGSHP, o gene HGPRT e os sítios de restrições presente nas extremidades do gene.

#### 4.8 Construção do plasmídeo pGSN\_AM\_Hanta para expressão da proteína de interesse

##### 4.8.1 Preparo de células *E.coli* eletrocompetentes

Células de *E. coli*, comerciais e eletrocompetentes, DH5 $\alpha$  (Invitrogen), para transformação e clonagem dos plasmídeos, e BL21(DE3) (Promega), para indução e expressão da proteína, foram cultivadas. Para isso, uma única colônia da bactéria foi inoculada em 5 mL de meio Luria-Bertoni (LB) e a cultura foi incubada em agitação de 150 rpm a 37°C, durante 16h. Foi transferido 2 mL dessa cultura em 200 mL de meio LB sem antibiótico, mantendo em constante agitação de 250 rpm a 30°C até ser atingida a densidade óptica a 600nm (D.O.<sub>600nm</sub>) de 0,5-0,7. O frasco foi esfriado em gelo durante 15 minutos e a cultura transferida em tubos estéreis de 50 mL que foram centrifugados a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O

sobrenadante foi descartado completamente e o *pellet* de células ressuspensas gentilmente até total dissolução em 200 mL de glicerol a 10% estéril e gelado. Em seguida, os tubos foram incubados no gelo por 15 minutos para uma nova centrifugação a 3.000 rpm/10 minutos/4°C. O sobrenadante foi despejado completamente e o *pellet* ressuspensado em 10 mL de glicerol a 10% gelado e estéril. Estas etapas de centrifugação e ressuspensão foram repetidas mais 2 vezes, com 4 mL e 1 mL de glicerol. Ao final, o *pellet* foi ressuspensado gentilmente em 1 mL de glicerol a 10% gelado e estéril. As células eletrocompetentes foram alíquotadas em 80-100 µL, e armazenadas imediatamente a -80 °C. Todo o procedimento ocorreu em gelo.

#### 4.8.2 Transformação e clonagem dos vetores plasmidiais na hospedeira *E. coli*

Existem vários métodos de transformação, como química e eletricamente. A transformação por eletroporação é uma forma simples e rápida de introduzir DNAs exógenos em células bacterianas por meio de choques elétricos de alta voltagem que fundem a membrana procariota por milissegundos, criando poros e possibilitando a entrada do material genético externo para dentro da célula hospedeira (PRIMROSE et al., 2001).

Tanto o vetor sintético pBSK, contendo o gene da proteína N\_AM\_Hanta, quanto o plasmídeo recombinante pGSHP, contendo o inserto HGPR1 e que servirá como plasmídeo de expressão neste trabalho, foram trabalhados simultaneamente. Uma alíquota de cada solução contendo os plasmídeos de interesse (1µL) foi misturada a 80 µL de células *E. coli* DH5α eletrocompetentes e transferidos para a cubeta de eletroporação de 2mm. Foi aplicado 2 pulsos elétricos de 1900 volts em aparelho de eletroporação (Modelo Electroporator 2510 – Eppendorf). Imediatamente após o pulso, foi adicionado 250 µL de meio LB na cubeta, revigorando as células transformadas. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C em agitação a 150 rpm. Em seguida, alíquotas foram plaqueadas em placas de petri com meio LB-ágar contendo o antibiótico ampicilina (100µg/mL). Ao final, as placas foram incubadas invertidas a 37°C durante 16 h ou *overnight*.

#### 4.8.3 Identificação dos fragmentos dos insertos nos plasmídeos por análise de restrição

Após os processos de transformação bacteriana e crescimento em meio sólido dos plasmídeos de interesse (pBSK e pGSHP), foram escolhidas as colônias mais isoladas para crescimento celular em meio líquido. Duas colônias bacterianas de cada clone plasmidial foram inoculadas uma em cada tubo com 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100µg/mL). Os tubos foram seguidamente incubados a 37°C durante 16 h ou *overnight* e em agitação a 150 rpm e de forma inclinada, para maior aeração e melhor rendimento de crescimento celular bacteriano. Foi então realizada a extração dos plasmídeos de interesse por meio do *illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare Life Sciences), seguindo suas especificações. Os plasmídeos extraídos foram analisados em gel de agarose a 0,8% e 0,01% de brometo de etídio, com corrida de eletroforese a 100 walts e 100 volts, para visualização e avaliação do rendimento da extração plasmidial.

Os vetores extraídos foram submetidos à digestão enzimática com as enzimas de restrição *NdeI* e *NotI* por 2h a 37°C, conforme tabelas 19 e 20, apêndice A, para liberação dos insertos HGPRT e N\_AM\_Hanta dos plasmídeos pGSHP e pBSK, respectivamente, e analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e 0,01% de brometo de etídio. Após a nova incubação com as enzimas digestivas (tabelas 21 e 22, apêndice B) e separação das bandas no gel, os fragmentos correspondentes ao gene da proteína N\_AM\_Hanta e plasmídeo pGS linearizado foram cortados do gel e purificados utilizando o kit de purificação *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Spin Kit* (GE Healthcare Life Sciences).

#### 4.8.4 Inserção do fragmento da proteína N\_AM\_Hanta no vetor de expressão pGS

O fragmento de DNA correspondente ao gene N\_AM\_Hanta, já purificado, foi inserido ao vetor pGS, também purificado, utilizando os sítios de restrição *NdeI* e *NotI*, por 16 horas a 10°C conforme ilustrado na tabela 23, apêndice C. O sistema de ligação foi realizado na

proporção de 2:1 (vetor/inserto), utilizando a enzima T4 DNA ligase, proveniente da empresa New England Biolabs Inc. Após a ligação da sequência codificadora da proteína N\_AM\_Hanta ao vetor pGS, o plasmídeo construído passou a se denominar pGS\_N\_AM\_Hanta.

Após sistema de ligação, o plasmídeo PGSNH foi transformado por eletroporação em células bacterianas de *E. coli* DH5 $\alpha$ , submetido a crescimento celular em meio líquido, extraídos por meio do *illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE®) e, por fim, inoculado em gel de agarose para avaliação do rendimento de concentração plasmidial. O novo plasmídeo recombinante foi submetido à digestão enzimática com as enzimas *NdeI* e *NotI* (tabela 24, apêndice C), para confirmação da inserção do gene da proteína N\_AM\_Hanta ao vetor pGS.

#### 4.9 Indução e expressão da proteína N\_AM\_Hanta

##### 4.9.1 Transformação em *E. coli* BL21(DE3) e pré-indução

Para expressão da proteína N recombinante, presente no vetor construído pGSNH, foi necessário introduzi-lo em células eletrocompetentes de *E. coli*, linhagem BL21(DE3) por eletroporação. Uma alíquota do pGS\_N\_AM\_Hanta (1 $\mu$ L  $\pm$  20ng) foi misturado a 80  $\mu$ L de células *E. coli* BL21 (DE3) eletrocompetentes e transferidos para a cubeta de eletroporação para aplicação de 2 pulsos elétricos de 1900 volts em aparelho eletroporador. Logo em seguida foi adicionado 250  $\mu$ L de meio LB na cubeta, revigorando as células transformadas, transferindo o conteúdo para um *ependorf* de 1,5 mL. Como controle de expressão, foi adicionado 250  $\mu$ L de meio LB em 80  $\mu$ L de células *E. coli* BL21 (DE3), sem o vetor nem eletroporação. Ambos os *ependorfs* foram incubados por 1 hora a 30°C em agitação a 150 rpm. Em seguida, a alíquota contendo o vetor foi plaqueada em placas de petri com meio LB-ágar contendo o antibiótico ampicilina (100 $\mu$ g/mL), enquanto a alíquota contendo apenas a hospedeira foi plaqueada em placas de petri com meio LB-ágar sem antibiótico. Ao final, as placas foram incubadas invertidas a 30°C durante 16 horas ou *overnight*.

No dia seguinte preparou-se os materiais de pré-indução, inoculando uma colônia de cada sistema em 5 mL de meio LB líquido para crescimento durante 16 horas ou *overnight* sob agitação a 150 rpm a 30°C. A colônia contendo o vetor foi inoculada em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, enquanto a hospedeira vazia em meio LB líquido sem antibiótico. Após o período de crescimento anteriormente mencionado, foram aliqüotados 1 mL de cada pré-inóculo em 250 mL de meio LB líquido, de forma que a hospedeira transformada esteja em meio contendo antibiótico (ampicilina 100µg/mL) e a hospedeira vazia em meio LB sem antibiótico. Essas novas culturas foram reincubadas, por cerca de 3 h, sob as mesmas condições, até atingir densidade ótica com leitura espectrofotométrica a 600nm (D.O.<sub>600nm</sub>) de 0.6-0.8 (primeira metade da fase de crescimento logarítmica).

#### 4.9.2 Indução e expressão da proteína N\_AM\_Hanta

Atingida a densidade ótica mencionada, a indução foi promovida para que as bactérias produzissem a proteína N\_AM\_Hanta, por meio da adição às culturas o isopropil-D-tiogalactopiranosida (IPTG) (Gibco, EUA) a uma concentração final de 1 mM. As culturas foram incubadas por 5 h, sendo que a cada hora foi coletado 1 mL desta cultura para determinação da cinética de expressão. Estas amostras de 1 mL da cultura foram centrifugadas a 15000 g por 5 minutos, o sedimento foi estocado a -20 °C. Ao final do tempo de indução, cada volume de 250 mL de cultura foi transferido para um tubo de 50 mL, e esses tubos centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C, armazenando o *pellet* a -20 °C até a etapa de solubilização e purificação.

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 12%, com 200 volts e 30 watts, por cerca de 45 minutos, em sistema de Eletroforese Mini-Protean (BioRad, EUA). O gel foi corado com azul de Coomassie (0,25% de azul de coomassie brilhante, 45% de metanol, 10% de ácido acético e H<sub>2</sub>O MilliQ) por 30 minutos e descorado numa solução de metanol a 45% e ácido acético a 10%, por 3 horas.

#### 4.10 Extração e Purificação da proteína N\_AM\_Hanta

Primeiramente os sedimentos recuperados de um volume de 250 mL de cultura de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o vetor pGS\_N\_AM\_Hanta e da hospedeira vazia foram inicialmente descongelados e mantidos em gel durante todo o procedimento para evitar a efeito das proteases. Durante o processo, utilizaram-se tampões, listados na tabela 27, apêndice F.

Os sedimentos foram submetidos a fase de lise, adicionando 10 mL de tampão A, 100 $\mu$ L de Lisozima a 100mM (Sigma, EUA) e 500 $\mu$ L de PMSF (1mg/mL) até completa ressuspensão e incubados em gelo (4°C) por 30 minutos. A lisozima facilita a lise da parede celular bacteriana e o PMSF (fluoreto de fenol sufonil), por sua vez, é um inibidor de proteases. Após sonicação a 200 watts e 20 khz em sonicador ultrasônico QR200 Ultronique, em gelo, por 5 ciclos de 30 segundos, em intervalos de 20 segundos, o lisado foi centrifugado a 4.000 rpm, a 4°C, por 20 minutos. O sobrenadante (sobrenadante 1) foi armazenado a -20 °C para futura análise quanto à presença da proteína solúvel, e o sedimento 1 foi ressuspensão em Tampão B desnaturante e incubado em gelo (4°C) por 30 minutos. A seguir, o lisado foi centrifugado a 4.000 rpm a 4°C, por 20 minutos, e o sobrenadante (sobrenadante 2) e o *pellet* 2 resultantes foram armazenados a -20 °C para análise de proteína solúvel em SDS-PAGE. Processo esse foi ilustrado na figura abaixo, cujos produtos que foram analisados quanto à solubilidade da proteína estão destacados.

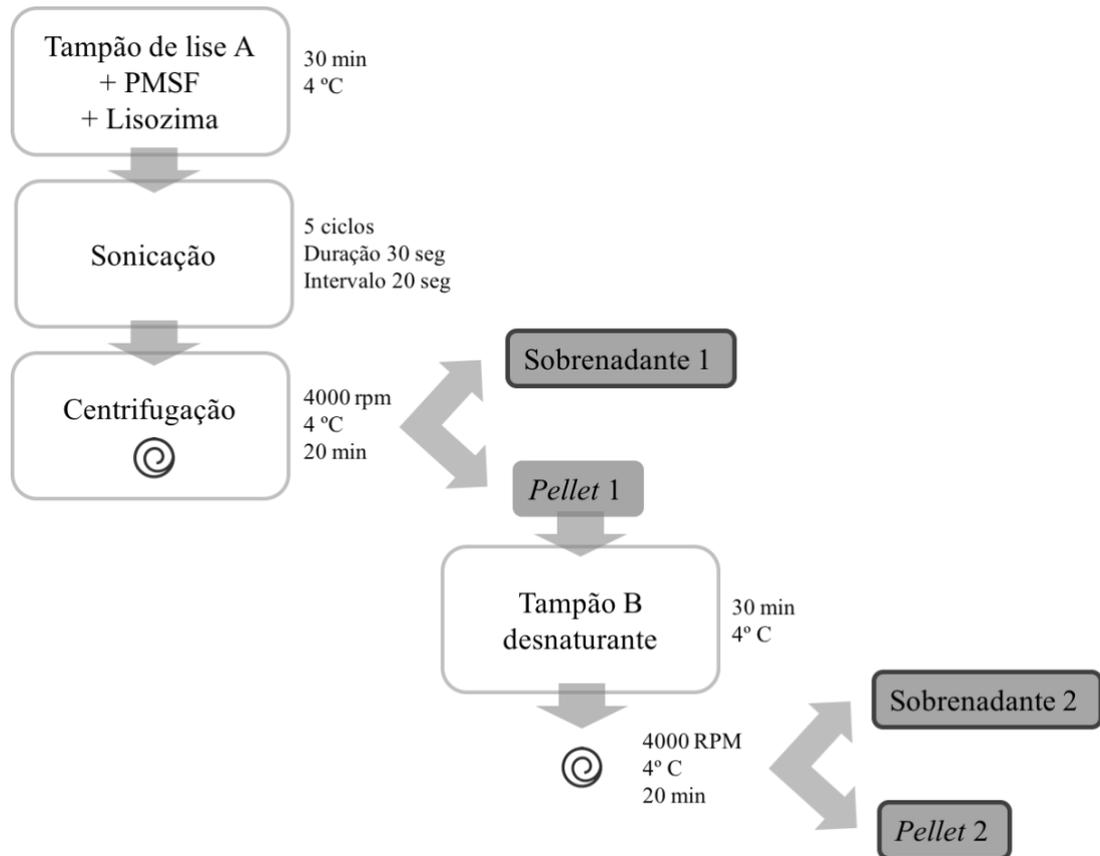


Figura 8. Processo de extração da proteína N\_AM\_Hanta da hospedeira e separação dos produtos em destaque para análise de solubilidade da proteína.

O método de purificação utilizado foi por cromatografia de afinidade por meio de uma coluna de níquel (IMAC - *immobilized metal affinity chromatography*). A cauda de polihistidina (*His6x-tag*) presente na proteína N\_AM\_Hanta tem afinidade por esse metal carregado na coluna. Adicionou-se a uma coluna de níquel com capacidade de 1 mL (HisTrap HP® 1mL - GE healthcare life Science) um volume acima desse limite. O tampão eluente utilizado para equilibrar a coluna foi tampão B desnaturante, enquanto o tampão C foi o responsável por coletar a proteína N\_AM\_Hanta recuperada, a qual foi analisada em SDS-PAGE. Todos os materiais utilizados (tampões) e resultantes dos processos (proteína extraída e purificada) foram filtrados com membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ .

O produto final foi submetido a um processo de diálise para redução da concentração de ureia e do imidazol, além da redução do pH. O material foi empacotado em um tubo de

diálise (Millipore®) e sustentado por 8 horas em solução I de diálise com ureia 4M, seguido por mais 8 horas em solução II de diálise com ureia 0,5M, sendo as incubações sob agitação. Ambas as soluções foram descritas na tabela 28, apêndice F.

#### 4.11 Quantificação da proteína N\_AM\_Hanta

Para a quantificação da proteína de interesse, utilizou-se o método do Bradford (Bradford, 1976, EUA). Para tanto, preparou-se, de forma seriada, soluções de albumina de soro bovino (BSA), nas diluições de 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL, visando gerar uma curva proteica padrão. Em seguida, 10 µL de cada solução de BSA foi adicionado a um volume de 200 µL do reagente de Bradford + 790µL de água Milli-Q, preparando soluções com diluição 1:100. O branco da curva foi preparado com 200 µL do reagente de Bradford e 800µL de água Milli-Q. Simultaneamente, 10 µL da amostra a ser quantificada (proteína N\_AM\_Hanta) foi também preparada em diluição 1:100 com o complexo reagente de Bradford+água Milli-Q. Todas as soluções foram incubadas por 5 min, a 28°C (temperatura ambiente) e medidas as suas absorvâncias em espectrofômetro BioMate 3 (Thermo Electron Corporation, EUA) com filtro de 595 nm. Observou-se uma cor arroxeadada nas preparações, nos quais a intensidade da coloração estava diretamente relacionada aos teores proteicos. A curva proteica padrão foi gerada pelos valores de DO's de BSA e, baseada na equação de reta com valor de  $R^2=0,95$ , o valor encontrado na aferição para a proteína N\_AM\_Hanta foi de 680 µg/mL.

#### 4.12 Sequenciamento do fragmento codificador da proteína N\_AM\_Hanta

O sequenciamento foi realizado com colaboração da Plataforma de Genômica da unidade Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), da Fundação Oswaldo Cruz. Realizou-se a reação de sequenciamento com o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific, EUA) seguindo especificações do fabricante bem como modificações da

plataforma, segundo Naveca (2012). Para tal, utilizou-se por reação aproximadamente 150 a 300 ng dos plasmídeos e primers na concentração final de 0,32  $\mu\text{M}$  que se ligam em sítios próximos ao local dos promotores do vetor (T7 Forward: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' e T7 Reverse: 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'). A reação de sequenciamento foi desenvolvida por meio de sequenciamento capilar de ácidos nucleicos do tipo Sanger no sequenciador automático *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA) utilizando um gel de poliacrilamida a 6%.

#### 4.13 Antigenicidade da proteína por *Western Blotting* (WB)

*Western blotting* também, conhecido como *protein blotting* ou *immunoblotting*, é um método rápido de alta sensibilidade e especificidade em biologia molecular utilizado para detecção, caracterização e quantificação de proteínas após a separação destas em corrida de gel por eletroforese e consecutiva transferência para membrana adsorvente (MIGUEL et al., 2012).

A proteína N recombinante purificada foi confirmada por WB, além de ratificar as amostras usadas nesse trabalho como controle positivo e negativo no ELISA. Foram preparadas duas soluções na proporção 1:1 com azul de bromofenol: (1) 50  $\mu\text{L}$  ( $\pm 42,5\mu\text{g}$ ) da proteína N purificada com 50  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol e (2) 50  $\mu\text{L}$  tampão de eluição da proteína com 50  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol. Essas soluções foram incubadas por 5 minutos em fervura no banho-maria a 100°C antes da deposição no gel para corrida de eletroforese. No gel, foi inserido alíquotas do marcador de peso molecular para proteínas (PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa, Thermo Fisher Scientific, EUA) e alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  das soluções com a proteína ( $\pm 2\mu\text{g}/\text{poço}$ ) e com o tampão de eluição, alternadamente. Em seguida, foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) a 12% com 200 volts, por 2 h.

Montou-se, então, o sistema de transferência: um sanduíche gel-membrana entre 2 papéis de filtro absorventes e espuma de cada lado embebidos em tampão de transferência

(transferência úmida). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad, EUA) com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  por *electroblotting* utilizando o sistema de Eletroforese Mini Trans-Blot® (BioRad, EUA), em solução tampão de transferência, descrito na tabela 29, apêndice F. A transferência foi realizada em gelo (para evitar aquecimento do tampão de transferência), a 100 volts e 200 mA, por três horas e à temperatura ambiente. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada, para evitar reações inespecíficas, adicionando-se solução de leite desnatado a 5% em PBS, por 16 horas a 4°C.

Em seguida, a membrana foi cortada ao meio e adicionados os soros (anticorpo primário) na proporção 1:1000 diluídos em PBS. Em uma metade da membrana, incubou-se com um soro de paciente conhecidamente positivo para *Hantavírus*, enquanto na outra metade adicionou-se um *pool* de 5 soros conhecidamente negativos. Após 45 minutos de incubação, à temperatura ambiente e sob agitação, as membranas foram lavadas 5 vezes com solução salina (NaCl 0,9%) e adicionou-se o anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase, preparado em roedor (Pierce, EUA) na proporção 1:1000 em PBS. A membrana foi incubada por 45 minutos à temperatura ambiente, sob agitação e lavada novamente, por 5 vezes, com solução salina.

Finalmente, detectou-se a reação antígeno-anticorpo-conjugado, acrescentando a solução do substrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de oxigênio ultrapuro) à concentração de 1,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , na presença de DAB (3,3',4,4' Diaminobenzidina) (BioRad, EUA) à concentração de 0,5 mg/mL, diluído em PBS. Incubou-se as membranas com esta solução por 5 minutos e a reação foi interrompida por lavagem da membrana com água destilada, sendo, por conseguinte, deixadas para secar em papel de filtro absorvente. Ao final, observou-se na membrana bandas correspondentes à proteína N do *Hantavírus*, com aproximadamente 51 kDa.

#### 4.14 ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay* – ensaio imunoenzimático)

##### 4.14.1 Padronização do ELISA para detecção de anticorpos IgG contra a proteína N recombinante

Para a realização do ensaio, a etapa de bloqueio das reações inespecíficas é primordial. Portanto, para escolha do bloqueador mais adequado foram realizados vários testes com soluções contendo soro fetal bovino a 5% em PBS, soro de cavalo a 5% em PBS, soro de albumina bovina a 1% em PBS e leite em pó desnatado a 1 e 10% em PBS. Esta última, leite em pó a 10%, mostrou menor *background* à leitura espectrofotométrica das microplacas ao final do teste e, portanto, foi a mais adequada para uso no ELISA.

Na padronização do teste foi utilizada a técnica de “*checkerboard*” para otimização de concentrações e diluições dos imunoreagentes. Foram experimentadas diferentes concentrações do antígeno de 1, 2, 4, 6, 8 µg/mL e diluições seriadas de amostras conhecidamente positivas e negativas na razão 2 (1:50 até 1:1600). Com base no resultado destes testes, decidiu-se utilizar o antígeno na concentração de 2 µg/mL e os soros na diluição 1:100, pois estas foram as medidas que melhor discriminaram a reatividade encontrada.

Para o ELISA, foram utilizadas microplacas rígidas de poliestireno de fundo chato de 96 poços do tipo MaxiSorp® (Nunc, EUA). O desenho experimental em cada placa, como ilustra a Figura 9, foi determinado da seguinte forma: as duas primeiras tiras serviram como controle do teste, sendo a primeira (coluna 1) sensibilizada com o tampão de solubilização da proteína (solução II ureia 0,5M) e a segunda (coluna 2) com o próprio antígeno N\_AM\_Hanta. As outras 10 tiras (colunas 3 a 10), atribuídas para análise das amostras do estudo, foram sensibilizadas normalmente com o antígeno de interesse.

As tiras-controle 1 e 2 ainda eram divididas em linhas, onde: (A) branco (sensibilizada com tampão carbonato-bicarbonato e sem amostra); (B) controle do antígeno (sem amostra); (C,D) controle anticorpo primário (sensibilizada com tampão carbonato-bicarbonato e com

amostra); (E,F,G) controle negativo em triplicata (antígeno e *pool* de amostras conhecidamente negativas); e (H) controle positivo (antígeno e amostra conhecidamente positiva).

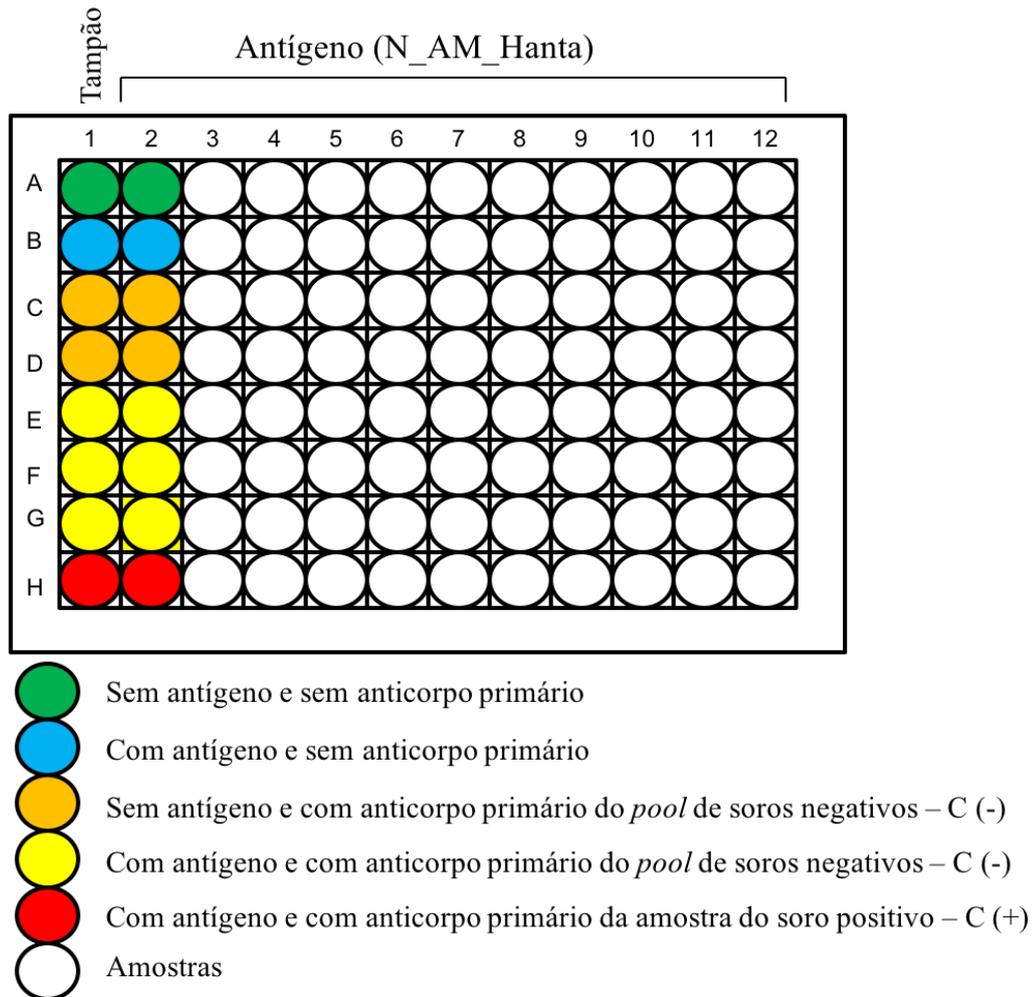


Figura 9. Desenho experimental da microplaca do teste de ELISA. Tiras-controle 1 e 2 seguem o modelo da legenda colorida. Tira 1 utiliza como “antígeno” apenas o tampão de solubilização da proteína (ureia 0,5M). Tiras 2 a 12 utilizam como antígeno a proteína N\_AM\_Hanta na concentração 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Tiras 3 a 12 para análise das amostras (bolas brancas). Poços sem antígeno = sensibilização com tampão carbonato-bicarbonato 0,5M, pH 9,6. Poços sem anticorpo primário = sem adição de amostra, apenas o tampão de diluição correspondente (PBS-T + LD10%).

#### 4.14.2 Procedimento do ELISA para análise das amostras

A composição dos tampões e soluções desse ensaio estão descritos na tabela 30, apêndice G. O teste se inicia com a sensibilização da placa com o antígeno, sendo recobertas com 2µg/mL de antígeno, diluído em Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,05M pH 9,6, e adicionando 50µL (100 ng da proteína N) por orifício. Ressalta-se que na primeira tira utilizou-se como “antígeno” a solução II ureia 0,5M, seguindo o modelo das linhas. As microplacas foram incubadas *overnight* a 4°C em câmara úmida e em seguida lavadas 5 vezes com solução de lavagem PBS-T 0,05%, removendo o líquido residual batendo a placa sob um papel absorvente limpo.

O bloqueio das microplacas foi realizado pela adição de 200 µL de solução composta por leite desnatado a 10% (LD 10%) diluída em PBS em cada poço da microplaca, incubando por 90 minutos a 28°C (temperatura ambiente) em câmara úmida. Após a lavagem por 4 vezes com PBS-T e remoção residual, foi adicionado um volume de 50µL de cada amostra e controles na diluição 1:100 em solução de diluição de anticorpos (PBS-T + LD10%). Após adição dos anticorpos primários, a microplaca foi incubada por 30 minutos a 28°C (temperatura ambiente) em câmara úmida, homogeneizando a cada 15 minutos, e lavada 5 vezes com PBS-T. Em seguida, foi adicionado 50µL em cada poço da microplaca a imunoglobulina caprina anti-IgG humano, específico para cadeia  $\gamma$ , conjugada com peroxidase (ThermoFisher Scientific, EUA), na diluição 1:4000 em PBS-T + LD10%, incubando por 30 minutos a 28°C (temperatura ambiente) em câmara úmida, homogeneizando a cada 15 minutos e, ao final, lavando 5 vezes com PBS-T e removendo o líquido remanescente.

Por conseguinte, foi realizado a reação colorimétrica por meio da adição de 50µL de substrato fotossensível 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço, deixando desenvolver suficientemente uma coloração, geralmente entre 30 a 60 segundos e, logo em seguida, bloqueando a reação com a adição de 50 uL de ácido sulfúrico 3M em cada poço. As

microplacas eram tampadas com papel alumínio, protegendo-as da luz, para consecutivamente serem realizadas as leituras das absorbâncias de cada orifício em leitora de placa multitecnológica CHAMELEON™ V e filtro de absorbância de 450 nm (MORELI, 2005; SCHMIDT et al., 2006).

#### 4.14.3 Cálculo do ponto de corte (*cut-off*)

Primeiramente, realizava-se o *background*, o qual era calculado por meio da média das densidades ópticas (DOs) da triplicata do controle negativo (*pool* de amostras conhecidamente negativas) onde se utilizou o tampão ureia como “antígeno”, ou seja, linhas E, F e G da coluna 1, e assim subtraía-se esse valor de todos os outros valores de DOs, para redução de viés em relação ao tampão de solubilização da proteína N e de anticorpos não-específicos para o antígeno de interesse.

O ponto de corte resultou da média da triplicata do controle negativo da coluna 2, que utiliza a proteína N como antígeno, acrescida de 3 desvios-padrões. Foram consideradas positivas, as amostras em teste cujas DOs foram maiores que o valor do ponto de corte. Foram consideradas indeterminadas, as amostras em teste cujas DOs foram menores que o valor do ponto de corte, contudo maior que a média da triplicata do controle negativo (sem o acréscimo dos 3 desvios-padrões), como ilustra a figura abaixo.

$$Cut-off_{ELISA} = \left( \frac{E2 + F2 + G2}{3} \right) + \left( 3 \times \text{Desvio Padrão} \right)$$

$$\text{Resultado}_{ELISA} \begin{cases} \text{Amostra positiva} > Cut-off \\ Cut-off > \text{Amostra indeterminada} > \text{Média de } \textcircled{\bullet} \end{cases}$$

Figura 10. Cálculo do ponto de corte (*cutoff*) e interpretação dos resultados no ensaio de ELISA.

#### 4.15 Dot Blot

As amostras consideradas positivas e indeterminadas por meio de marcador enzimático foram submetidas a um teste de confirmação de maior sensibilidade e especificidade ante a proteína N, uma vez que técnicas de *immunoblotting* são rápidas para detectar e identificar proteínas (YEE et al., 2003; MATTAR et al., 2015). É similar ao teste de WB, diferindo apenas na captação da amostra da proteína, pois essa não passa por uma separação eletroforética, contudo são observadas por meio de moldes circulares aplicados diretamente sob membranas de nitrocelulose (STOTT, 1989).

Para padronização do teste, foram testadas duas concentrações do anticorpo primário (1:1000 e 1:2000) e 10 concentrações da proteína, de forma seriada, de razão 2, de 1,8ng a 920ng, frente ao controle positivo e três controles negativos. Pôde-se observar que o controle positivo reagiu com todas as quantidades e os controles negativos reagiram inespecificamente com 920 ng e 460 ng de proteína N (retângulo vermelho), como ilustra a Figura 11. Portanto, a maior e melhor quantidade para detecção específica de amostras positivas para *Hantavírus* foi estabelecida em 230 ng. Agregado a isso, foi determinado também uma menor quantidade de trabalho da proteína (10ng) com intuito de verificar amostras que possam ter alta titularidade de anticorpos contra proteína N do *Hantavírus*. Baseado no resultado dos testes realizados, a concentração ideal de trabalho para o soro (anticorpo primário) foi de 1:2000.

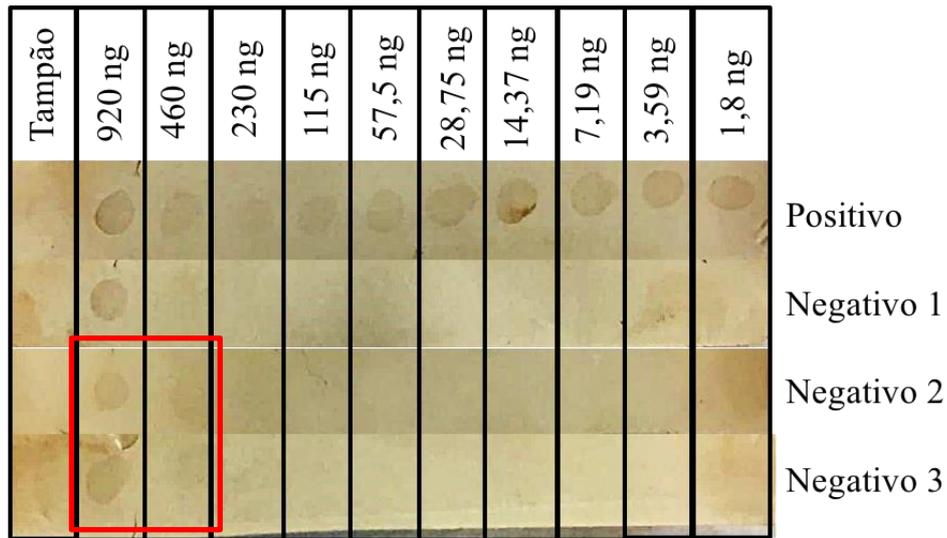


Figura 11. Padronização do teste de Dot Blot quanto à concentração ideal de proteína N a ser utilizada. Na primeira linha, observa-se que o soro controle positivo reagiu com todas as concentrações de proteína N. Na segunda linha, soro controle negativo 1 reagiu com 920 ng do antígeno, enquanto nas terceira e quarta linhas, os soros controle negativos 2 e 3, respectivamente, reagiram com 920 e 460 ng do antígeno, indicado pelo retângulo vermelho. Como controle do teste, nenhum dos soros reagiu com o tampão de eluição da proteína N.

As amostras foram analisadas em placas de cultura de 24 poços, onde em cada poço havia uma membrana sensibilizada com as quantidades pré-determinadas de proteína N para análise de uma amostra. Primeiramente, foi desenhado um *grid* com um lápis com formato de quadrados medindo 1cmx1cm, sem tocar na membrana. Em seguida, esses quadrados foram cortados e feito um pequeno corte em uma das pontas, o qual representou a deposição da gota de 2  $\mu$ L com a maior quantidade de proteína N purificada (230 ng), enquanto que a menor quantidade (10ng) ficou na direção contrária, conforme figura abaixo.

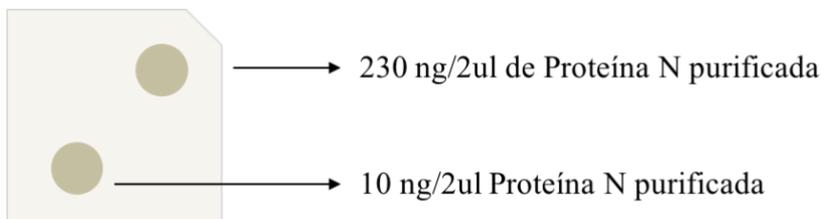


Figura 12. Representação esquemática da sensibilização das membranas de nitrocelulose para o teste de Dot Blot. A gota de 2 $\mu$ L com maior quantidade de proteína N (230ng) depositada no local marcado por um pequeno corte na ponta da membrana e a gota com menor quantidade (10ng) no sentido contrário à gota anterior. Membrana de nitrocelulose 0,45 $\mu$ m (BioRad, EUA).

Foram preparadas soluções de 115 ng/ $\mu$ L e 5 ng/ $\mu$ L da proteína N purificada em PBS para deposição das gotas de 230 ng e 10 ng, respectivamente. Após plotagem dos volumes nas membranas de nitrocelulose de porosidade de 0,45 $\mu$ m (BioRad, EUA), deixou-as secar por 20 a 30 minutos. Em seguida, cada membrana com a proteína imobilizada foi transferida para um poço da placa de 24 poços, juntamente com a adição de 500  $\mu$ L por orifício da solução de bloqueio (leite desnatado a 10% - LD10% em PBS) por 3 horas a 4°C, para evitar ligações não-específicas nas membranas. Após retirada da solução de bloqueio, foi adicionado em cada poço 1 mL de solução de uma amostra na proporção 1:2000 em PBS-T (PBS + Tween 20 0,05%) + LD 10%, incubando por 45 minutos a temperatura ambiente (28°C) e homogeneizando a cada 15 minutos. As placas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem PBS-T, por 1 minuto cada lavagem, para posterior adição de 500  $\mu$ L na proporção 1:1000 em PBS-T + LD10% do anticorpo secundário anti-IgG humano, conjugado com peroxidase, específico para cadeia  $\gamma$  (ThermoFisher Scientific, EUA), incubando por 45 minutos a temperatura ambiente (28°C) e homogeneizando a cada 15 minutos. As placas foram lavadas novamente 3 vezes com solução de lavagem PBS-T, por 1 minuto cada lavagem.

Finalmente, acrescentou-se 400  $\mu$ L por poço da mistura do substrato comercial DAB (3,3',4,4' diaminobenzidine) (BioRad, EUA), à concentração de 0,5 mg/mL e 1,5  $\mu$ L/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de oxigênio ultrapuro), diluídos em PBS. Incubou-se as membranas com esta solução por 5 minutos, sob agitação, e a reação foi interrompida por lavagem das membranas com água destilada, sendo, por conseguinte, deixadas para secar em papel de filtro absorvente. Conforme ilustra a Figura 13, as amostras foram consideradas positivas quando pôde ser observado os moldes circulares nas duas concentrações de proteína N\_AM\_Hanta (A) ou na maior delas (B), enquanto as consideradas negativas (C) não apresentaram molde em quaisquer concentrações.



Figura 13. Interpretação dos resultados na membrana de nitrocelulose no teste de Dot Blot. **A.** Amostra considerada positiva quando observado os moldes circulares nas duas concentrações de proteína N\_AM\_Hanta. **B.** Amostra considerada positiva quando observado reação na maior concentração de 230 ng de proteína. **C.** Amostra considerada negativa quando não observado nenhum tipo de reação na membrana.

#### 4.16 Análise estatística

Os dados epidemiológicos gerados pelos questionários aplicados nas diversas populações, com informações ligadas ao próprio indivíduo e/ou ao ambiente que o cerca, foram analisados pelos programas estatísticos STATA (versão 11), Prism (GraphPad, versão 7), e MedCalc (versão 16.8.4). Foi realizada uma avaliação geral da população do estudo, enquanto que as informações inerentes a cada município, comparações entre sexos e entre as populações de Manaus e Coari foram analisadas separadamente. As variáveis qualitativas foram realizadas por meio de testes de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) e modelos de regressão logística univariada e multivariada foram elaborados para analisar a força de associação entre variáveis independentes e a variável-resposta, ambos para  $\alpha$  de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise filogenética da proteína N\_AM\_Hanta

Para a filogenia, 45 sequências de aminoácidos selecionadas foram analisadas em 423 resíduos pelo método de Probabilidade Máxima, modelo de Jones-Taylor-Thornton e 1000 replicações do *bootstrap*. A sequência da proteína N\_AM\_Hanta exibiu maior proximidade com as espécies do clã do vírus *Andes*, o qual é majoritário e prevalente na América do Sul. Secundariamente, assemelha-se a espécies dos clãs dos vírus *Rio Mamoré* e *Laguna Negra*, os quais já foram identificados em regiões da Amazônia Legal.

### 5.2 Clonagem, expressão, purificação e confirmação da proteína N\_AM\_Hanta

Ao final dos processos de transformação e crescimento celular bacteriano foi realizada a extração dos plasmídeos de interesse e analisados em gel de agarose, como mostra a Figura 15A. Contudo, foi verificado que os clones do plasmídeo pGSHP foram extraídos em baixa concentração, indicado pelas setas pretas. Portanto foram elaborados novos processos de transformação, clonagem e extração e, por conseguinte, foi analisado em gel de agarose e pôde ser observado melhor rendimento em três novos clones (Figura 15B).

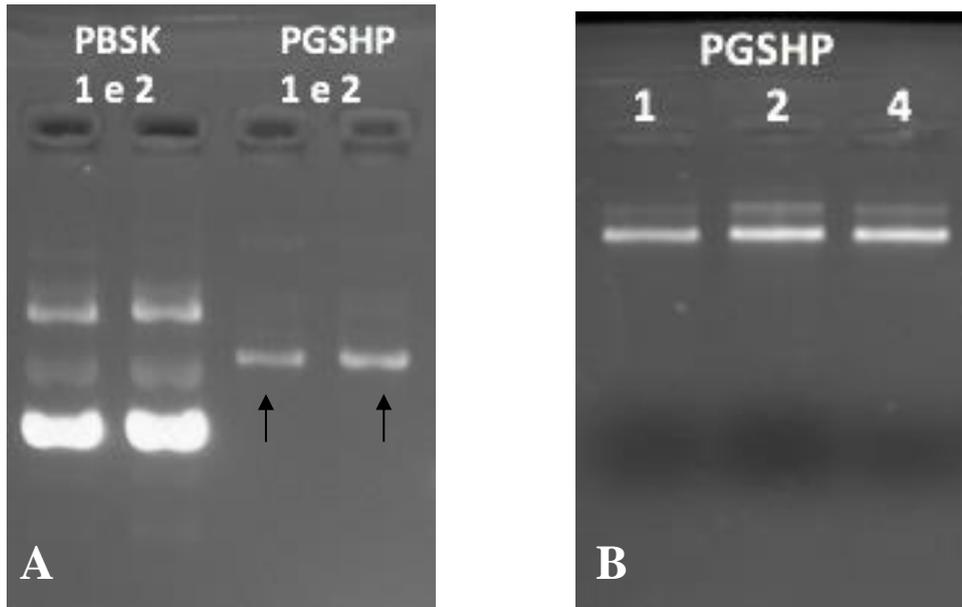


Figura 14. Gel de agarose em eletroforese com os plasmídeos pBSK e pGSHP extraídos dos clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas, utilizando kit Illustra GE®. **A.** Primeira extração com dois clones (1 e 2) de pBSK e dois clones (1 e 2) de pGSHP (setas pretas indicando baixa concentração do material extraído). **B.** Segunda extração com três clones de pGSHP (1, 2 e 4) com melhor rendimento e maior concentração do material genético. Gel de agarose a 0,8%, brometo de etídeo 0,01%, 30 minutos de corrida, 100V.

Os plasmídeos foram então submetidos à digestão enzimática com os sítios de restrição *NdeI* e *NotI*, como ilustra a Figura 16A. A coluna do meio é o marcador de peso molecular, na esquerda o vetor pBSK e o gene N\_AM\_Hanta e na direita o vetor pGS e o inserto HGPRT. As setas pretas indicam os fragmentos de DNA, resultados das suas respectivas digestões e suas distâncias relativas de migração eletroforética frente ao marcador molecular, confirmando a liberação das sequências, seja da N\_AM\_Hanta (aproximadamente 1370 pares de base), seja do plasmídeo pGS linearizado (aproximadamente 5500 pares de base).

Então, depois de confirmada a presença dos insertos nos vetores plasmidiais, com uma nova digestão enzimática, ocorreu a separação das bandas no gel de agarose, e os fragmentos correspondentes a proteína e ao plasmídeo de interesse foram cortados do gel, como ilustra a Figura 16B, e purificados, de acordo com a Figura 16C.

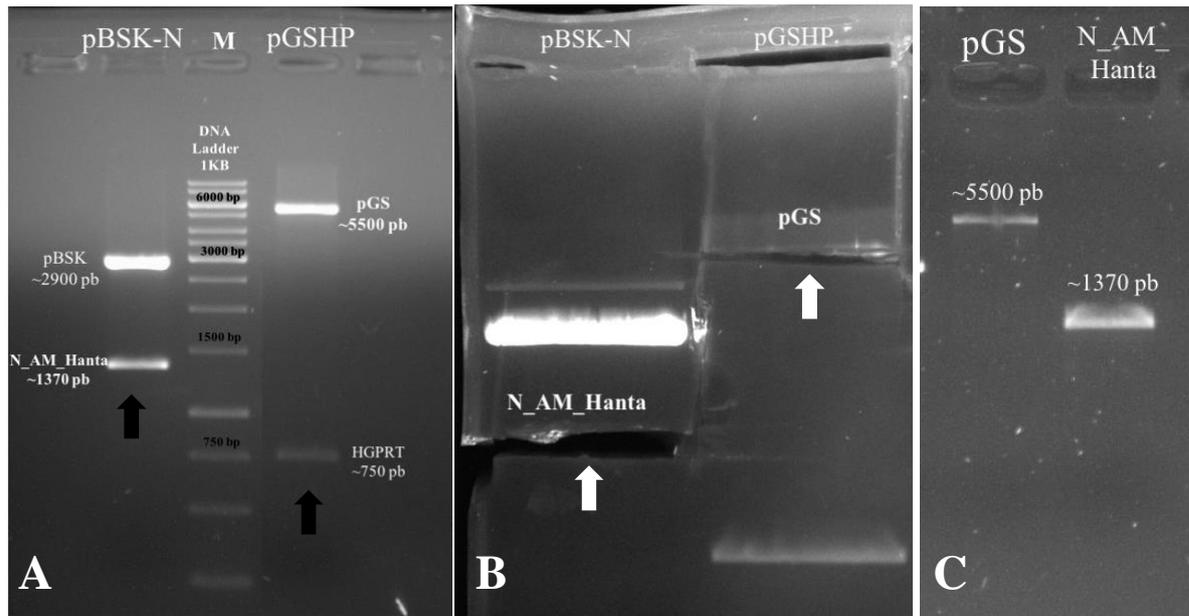


Figura 15. Digestão enzimática e purificação dos fragmentos da proteína N\_AM\_Hanta e vetor pGS. **A.** Perfil eletroforético da digestão do vetor pBSK contendo o gene de N (seta preta) e do vetor pGSHP contendo o gene da HGPRT (seta preta), utilizando *NdeI* e *NotI*. Gel de agarose a 0,8%, brometo de etídio 0,01%, 40 minutos de corrida, 100V. M: marcador de peso molecular. **B.** Perfil eletroforético da digestão pBSK-N e pGSHP-HGPRT e as setas brancas indicando o corte do gel no local de migração dos genes do inserto N\_AM\_Hanta e do vetor pGS linearizado. Gel de agarose a 0,8%, brometo de etídio 0,01%, 60 minutos de corrida, 80V. **C.** Perfil eletroforético dos genes do vetor pGS (à esquerda) e do inserto N (à direita) purificados. Gel de agarose 0,8%, brometo de etídeo 0,01%, 30 minutos de corrida, 100V.

Com os fragmentos da proteína N\_AM\_Hanta e do plasmídeo pGS purificados, o sistema de ligação foi realizado na proporção de 2:1 (vetor/inserto), utilizando a enzima T4 DNA ligase, proveniente da empresa New England Biolabs Inc. Após a ligação da sequência codificadora da proteína ao vetor, o plasmídeo construído passou a se denominar pGS\_N\_AM\_Hanta, como mostra a Figura 18. O novo plasmídeo recombinante foi analisado em gel (Figura 17A) e, em seguida, submetido à digestão enzimática com *NdeI* e *NotI* para avaliação e confirmação da inserção da proteína N\_AM\_Hanta (Figura 17B).

O resultado dos procedimentos realizados na seção 4.6.4 está ilustrado nas figuras abaixo, confirmando que houve a ligação do fragmento da proteína N\_AM\_Hanta ao vetor de expressão pGS. A fim de ratificar o resultado do sistema de ligação bem-sucedido, o plasmídeo pGS\_N\_AM\_Hanta construído foi submetido à digestão enzimática, e a Figura 17B ilustra o resultado desse processo por meio da migração eletroforética do inserto e a distância relativa

ante ao marcador de peso molecular. Na lacuna da esquerda temos o marcador de peso molecular, no meio o plasmídeo pGS\_N\_AM\_Hanta digerido e na lacuna da direita o mesmo plasmídeo não-digerido. A seta preta indica a liberação de um fragmento de aproximadamente 1400 pb, quando da dupla digestão do vetor pGS\_N\_AM\_Hanta com as enzimas *NdeI* e *NotI*. Resultado este, que confirma a proposta de construção deste trabalho. A sequência codificadora de N\_AM\_Hanta possui aproximadamente 1370 pb.

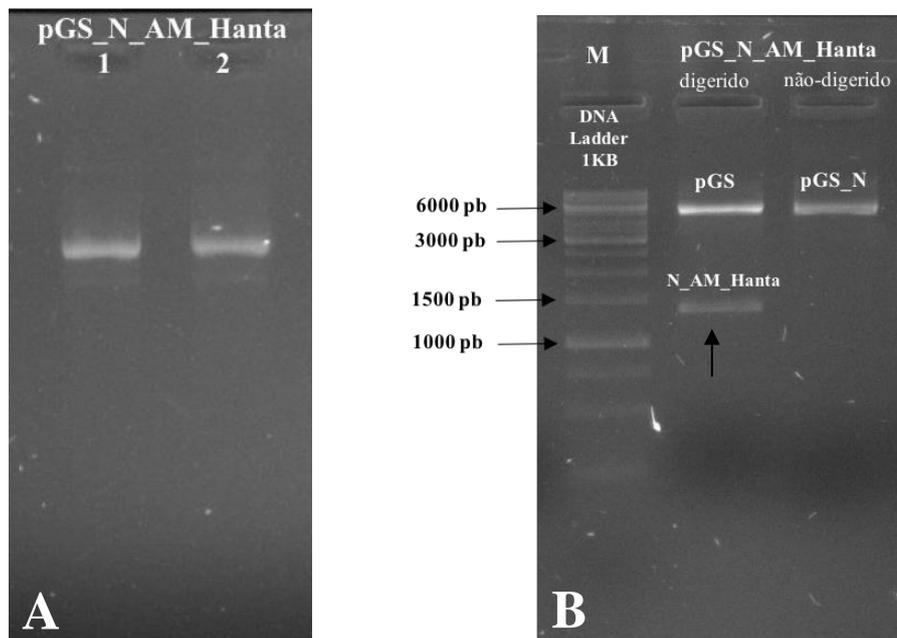


Figura 16. Introdução do fragmento da proteína N\_AM\_Hanta no vetor de expressão pGS. **A.** Perfil eletroforético de dois clones do sistema de ligação do plasmídeo pGS\_N\_Hanta não-digeridos. Gel de agarose a 0,8%, brometo de etídio 0,01%, 30 minutos de corrida, 100V. **B.** Perfil eletroforético da digestão do vetor contendo a proteína N\_AM\_Hanta (seta preta), utilizando *NdeI* e *NotI*. O controle negativo está representado pelo plasmídeo não-digerido na lacuna da direita e o marcador de peso molecular na lacuna da esquerda. Gel de agarose a 0,8%, brometo de etídio 0,01%, 40 minutos de corrida, 100V. M: marcador de peso molecular.

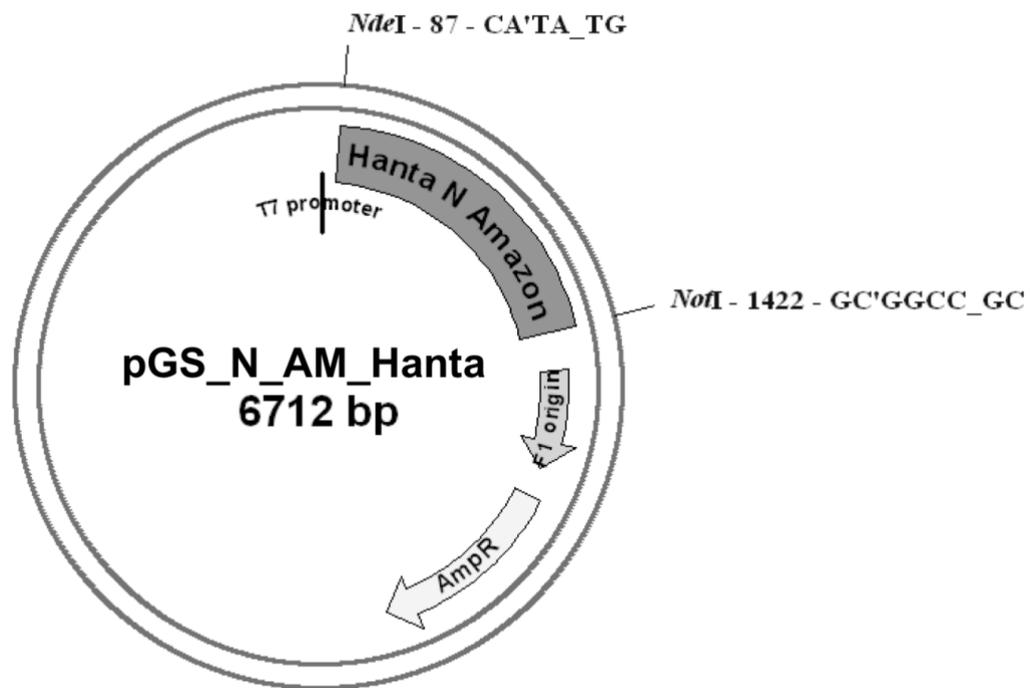


Figura 17. Mapa físico do plasmídeo pGS\_N\_AM\_Hanta com o promotor, os sítios de restrições e as localizações, o gene da proteína N\_AM\_Hanta, o gene de resistência ao antibiótico ampicilina (AmpR), o tamanho molecular total do plasmídeo e a origem F1.

### 5.2.1 Análise da expressão da proteína N\_AM\_Hanta

A expressão da proteína de interesse pode ser observada na Figura 19, a qual possui massa molecular de aproximadamente 50,8 kDa, conforme o cálculo teórico de massa molecular a partir da sequência de 428 resíduos de aminoácidos do gene N\_AM\_Hanta e mais 20 resíduos referentes a cauda histidina e enterokinase, o qual é de 50810,17 Da. Além disso, o marcador de peso molecular corrobora a massa molecular aproximada do produto de expressão. Na mesma figura é possível observar que a hospedeira *E. coli* BL21(DE3) sem vetor, o qual foi utilizada como controle, apresenta uma expressão basal de proteínas na região de 50 kDa. Pode-se observar também o perfil de expressão da proteína em diferentes tempos do experimento desenvolvido na seção 4.7.2.

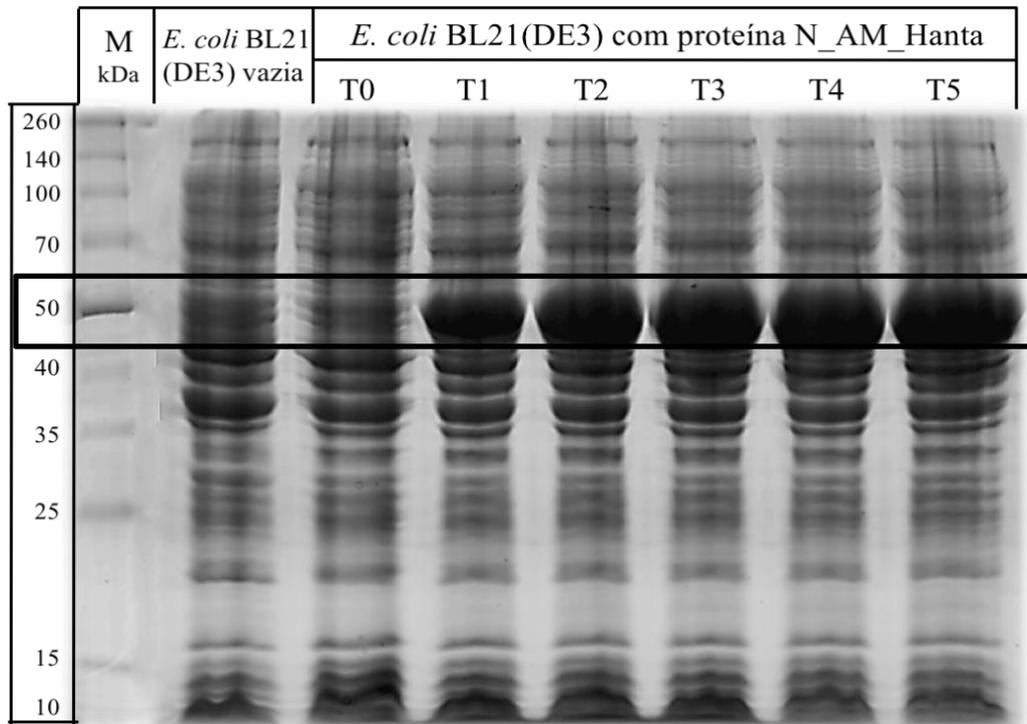


Figura 18. Gel de poliacrilamida com perfil de expressão da proteína N\_AM\_Hanta produzida pelo clone recombinante *E.coli* BL21(DE3) + pGS\_N\_AM\_Hanta. Alíquotas da hospedeira BL21(DE3) vazia e dos tempos de expressão após indução com IPTG de 0h, 1h, 2h, 3h, 4h e 5h do experimento estão mostradas. O retângulo preto demarca a migração dos produtos da expressão da proteína N (~51 kDa) com massa molecular aproximada frente ao marcador de peso molecular proteico. Gel de poliacrilamida 12%, 200 V, 2h. Revelação com azul de comassie. M: marcador de peso molecular.

### 5.2.2 Solubilidade e purificação da proteína N\_AM\_Hanta

Antes do processo de purificação da proteína, o sedimento proveniente do material de cultura induzido por 5h foi submetido a processos de extração com tampões de lise e desnaturação, consecutivamente. Os sobrenadantes e *pellet* resultantes desse procedimento, demonstrado na Figura 8 da seção 4.8, foram analisados quanto à presença de proteína solúvel, como ilustra a Figura 20 abaixo.

Quanto às lacunas correspondentes à extração, o sobrenadante 1 foi resultado da centrifugação e sonicação após ressuspensão com tampão de lise com lisozima e PMSF, enquanto o sobrenadante 2 e *pellet* 2 originados após centrifugação com tampão desnaturante. Pode-se observar que, em condições nativas, após tampão lise e sonicação, a proteína ainda não está solúvel, ficando aderida no sedimento. Esse sedimento, por sua vez, em condições

desnaturantes (tampão com uréia 8M), a proteína se apresenta solúvel no sobrenadante 2, ficando ainda retida em grande quantidade no *pellet* 2. As lacunas de expressão, nos tempos 0h e 3h, foram inseridas apenas a critério de comparação. O marcador de peso molecular proteico ilustra a massa molecular aproximada da proteína N\_AM\_Hanta (aproximadamente 51 kDa).

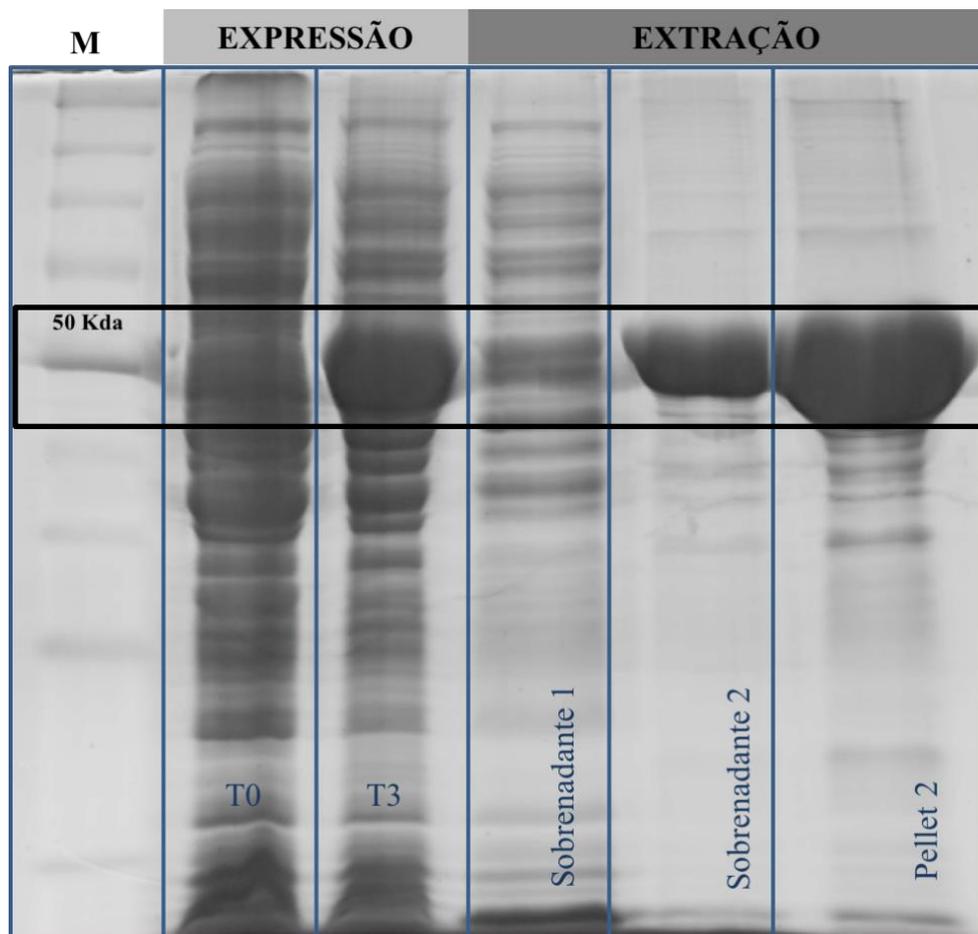


Figura 19. Gel de poliacrilamida com resultados da solubilidade da proteína N\_AM\_Hanta após processos de extração. Nas lacunas da extração, o sobrenadante 1 mostra a ausência da proteína em condições nativas, pós-uso de tampão de lise e sonicação. O sobrenadante 2 mostra a proteína solúvel em condições desnaturantes, ficando ainda retida no *pellet* 2. Tempos de expressão após indução com IPTG de 0h e 3h estão mostradas para comparação. O retângulo preto demarca os produtos da expressão da proteína N\_AM\_Hanta (~51 kDa) e material ressuspenso em condições desnaturantes com massa molecular aproximada frente ao marcador. Gel de poliacrilamida 12%, 200 V, 45 minutos. Revelação com azul de comassie. M: marcador de peso molecular.

Para a purificação da proteína utilizou-se uma coluna carregada com níquel. Em virtude da conjugação da proteína N\_AM\_hanta a uma cauda de polihistidina (6 moléculas), a proteína é coletada por afinidade. Esse método de cromatografia por afinidade permite analisar o processo de purificação por meio de uma curva de absorvância (linha azul da Figura 21) que afere a liberação de proteínas com picos.

Pode-se observar na figura que a proteína de interesse é liberada junto com outros produtos em um grande pico do ponto 1 ao 6, quando ainda não há imidazol (linha verde). O imidazol é responsável por competir com a proteína N de interesse na ligação ao metal níquel da coluna. Esse grande pico foi analisado em gel, representado pelo eluato 4, e indica que a capacidade de ligação da coluna foi saturada com grande quantidade de proteína inserida. Quando a concentração de imidazol passa a aumentar, ao tempo em que o tampão C de eluição é inserido, é possível ver um segundo pico (pontos 10 a 12) e que, quando analisado em gel pelo eluato 11, não representa a proteína de interesse.

Ao passo que a concentração de imidazol aumenta, surge um terceiro pico (pontos 13 a 18). Esses eluatos analisados em gel demonstram o deslocamento da proteína N\_AM\_Hanta da coluna já purificada, uma vez que as bandas correspondem ao tamanho de massa molecular da proteína (aproximadamente 51 kDa) quando comparadas ao marcador de peso molecular de proteínas. Essas frações foram unidas, dialisadas e apresentaram concentração final de 680 $\mu$ g/mL. O produto da extração (PE\*) representa um controle da eficácia do processo de purificação, de modo que visualmente se possa comparar o resultado da extração, com mais bandas inespecíficas, enquanto que as bandas da proteína purificada se apresentam únicas e específicas.

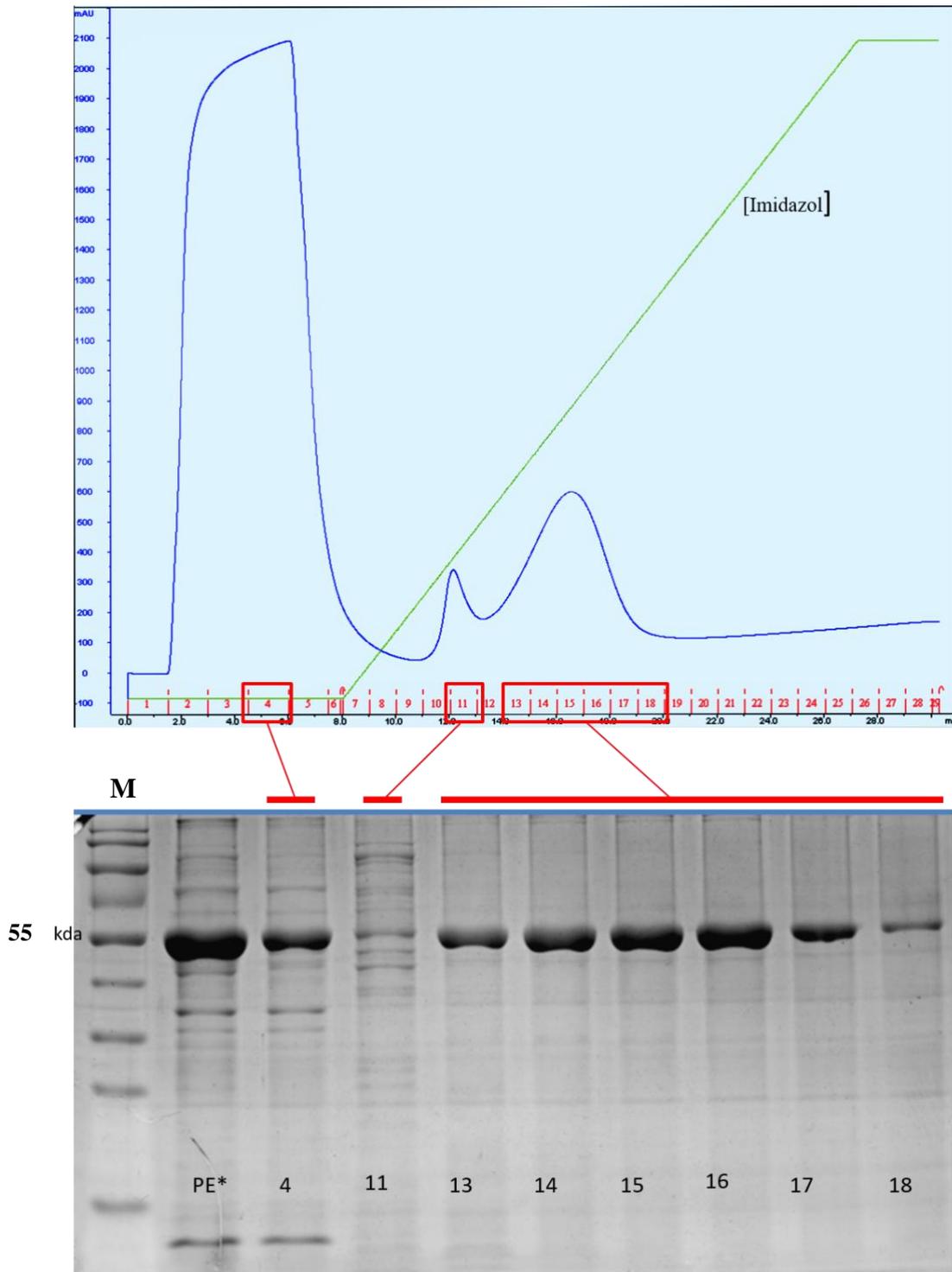


Figura 20. Curva de absorvância de purificação da proteína N<sub>AM</sub>Hanta e gel de poliacrilamida correspondente à análise das alíquotas dos eluatos do processo. O eluato 4, representando o primeiro pico, mostra a saturação da coluna, pois a proteína ainda estava presente nessa fase junto a outros elementos. No eluato 11, representando o segundo pico, não é detectada a proteína de interesse. Nos eluatos de 13 a 18, representando o terceiro pico, observa-se a obtenção da proteína N purificada, com bandas correspondentes ao tamanho da massa molecular da proteína (~51 kDa) ante ao marcador proteico. Gel de poliacrilamida 12%, 200 V, 30W, 45 minutos. Revelação com azul de comassie. PE\*: produto da extração. M: marcador molecular.

### 5.2.3 Teste de antigenicidade da proteína N\_AM\_Hanta por *Western Blotting* (WB)

Utilizou-se o método de WB para confirmação da capacidade de ligação da proteína purificada a anticorpos IgG contra *Hantavírus*. Para isso, foi selecionado um soro conhecidamente positivo para IgG contra *Hantavírus* e outro um *pool* de soros negativos para *Hantavírus*. Na Figura 22, pode-se observar duas membranas de nitrocelulose. Na membrana A, incubada com soro controle positivo, pôde ser observado a presença de banda exatamente no local onde havia proteína. O tampão de diálise da proteína foi empregado como controle do teste para garantir ligações não-específicas a outros componentes da solução. Na membrana B, incubada com controle negativo, não foi visualizado bandas, garantindo que o soro utilizado no ensaio de ELISA era, de fato, negativo contra o antígeno. Essa técnica permitiu a detecção e quantificação da proteína N\_AM\_Hanta (aproximadamente 51 kDa) por meio da comparação frente ao marcador de peso molecular proteico.

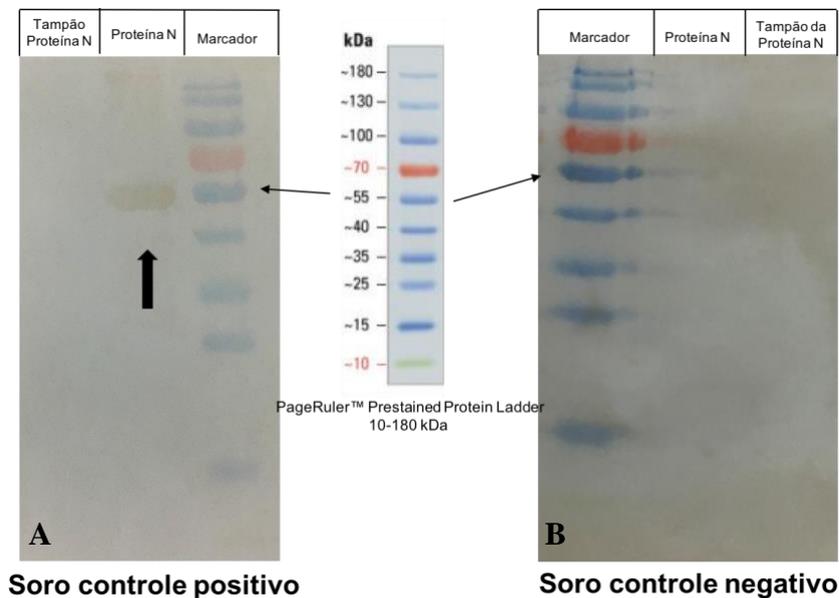


Figura 21. Antigenicidade por *Western blotting* da proteína N\_AM\_Hanta e confirmação dos soros-controle utilizados no ELISA. **A.** Membrana de nitrocelulose incubada com soro controle positivo permitiu a detecção específica de proteína N\_AM\_Hanta (~51kDa). A visualização de banda corresponde a ligação de anticorpos IgG específicos (indicado pela seta preta) na caneleta onde havia a proteína de interesse. **B.** Membrana de nitrocelulose incubada com soro controle negativo ilustrou a não-detecção de anticorpos IgG frente a proteína. Transferência por *electroblotting* pelo sistema de transferência úmida para membrana de nitrocelulose 0,45 $\mu$ m, por 120 minutos, 100V, à temperatura ambiente. O marcador de peso molecular é PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa.

### 5.2.4 Resultado da análise das amostras nos imunoenaios

Do total de amostras coletadas, foram analisadas 713 do município de Manaus, 642 de Coari e 64 de Itacoatiara. No primeiro teste de ELISA, das 1.419 amostras, foram selecionadas 183 (111 positivas e 77 indeterminadas). Essas foram reanalisadas por ELISA em triplicata e resultou em 99 amostras positivas, 69 indeterminadas e 15 negativas. As amostras positivas e indeterminadas (n=168) foram submetidas à confirmação por Dot Blot. Dessas, 87 amostras apresentaram molde circular na maior concentração de 230 ng de proteína N\_AM\_Hanta, enquanto que 74 ilustraram nas concentrações de 230ng e 10 ng, como mostra a Figura 23.

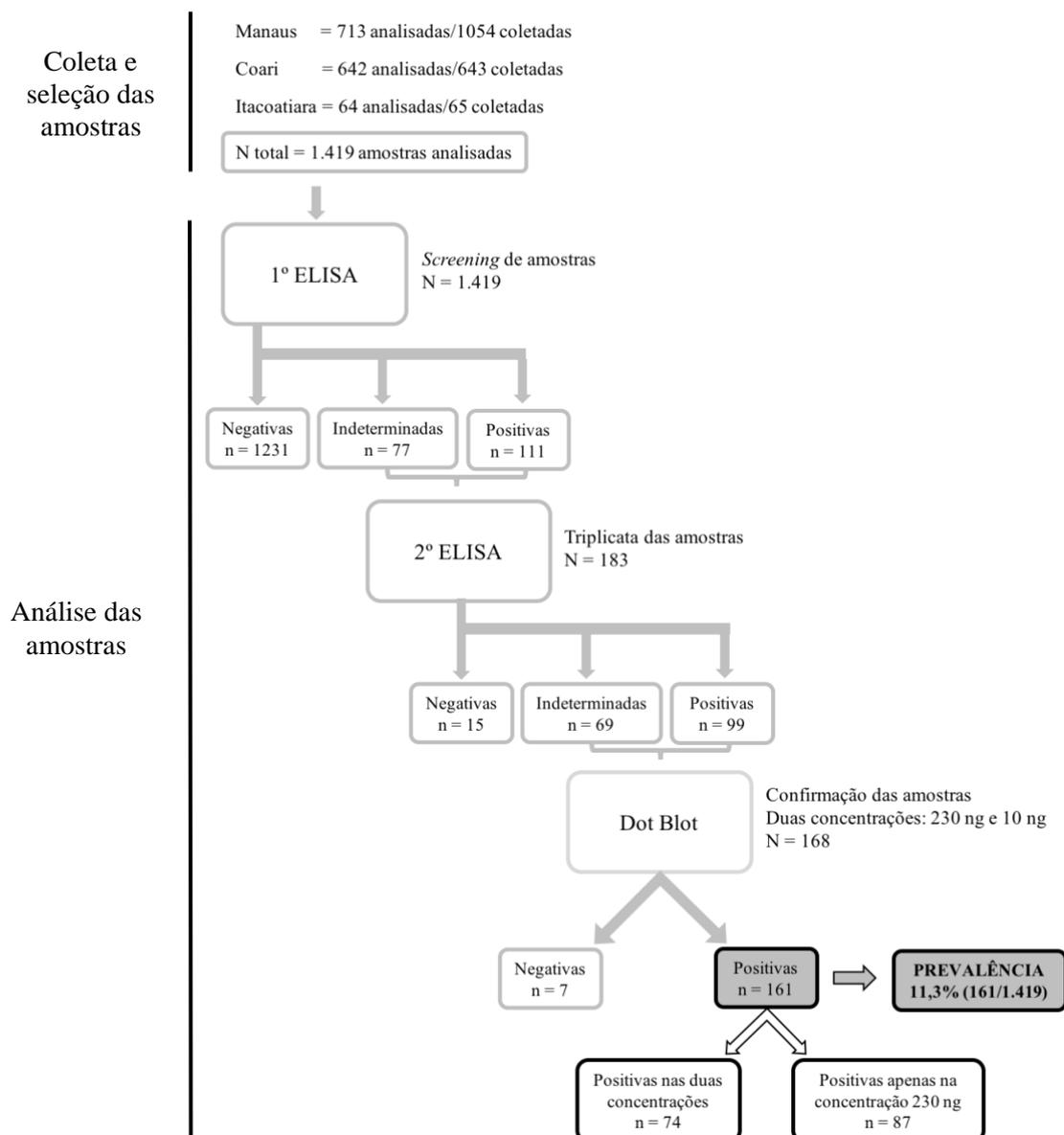


Figura 22. Fluxograma do resultado da análise das amostras nos imunoenaios.

### 5.3 Inquérito sorológico

#### 5.3.1 Análise da prevalência para *Hantavírus* na população total do estudo

##### 5.3.1.1 Características sociais, demográficas e econômicas

Dentre os 1.419 indivíduos analisados, 161 apresentaram anticorpos IgG para proteína N recombinante do *Hantavírus*, ou seja, 11,35% da população participante total no estudo. Desses 161 soropositivos, 47 (29,2%) pertence ao grupo de doadores de sangue do município de Manaus, 103 (64%) da população geral em Coari e 11 (6,8%) de trabalhadores florestais de Itacoatiara. O teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) mostrou que houve significância estatística quando se comparou o percentual de positividade entre os municípios ( $p < 0,001$ ).

Comparando a positividade para *Hantavírus* de um município com os demais, Manaus apresentou positividade de 6,6%, Coari de 16%, e Itacoatiara de 17,2%. Notou-se a positividade significativamente aumentada em Coari [ $p < 0,0001$ ; OR= 2,7 (IC<sub>95%</sub> 1,9–3,9)] e em Itacoatiara [ $p = 0,003$ ; OR= 2,9 (IC<sub>95%</sub> 1,4–6,0)] em relação a Manaus, como mostra a Figura 24.

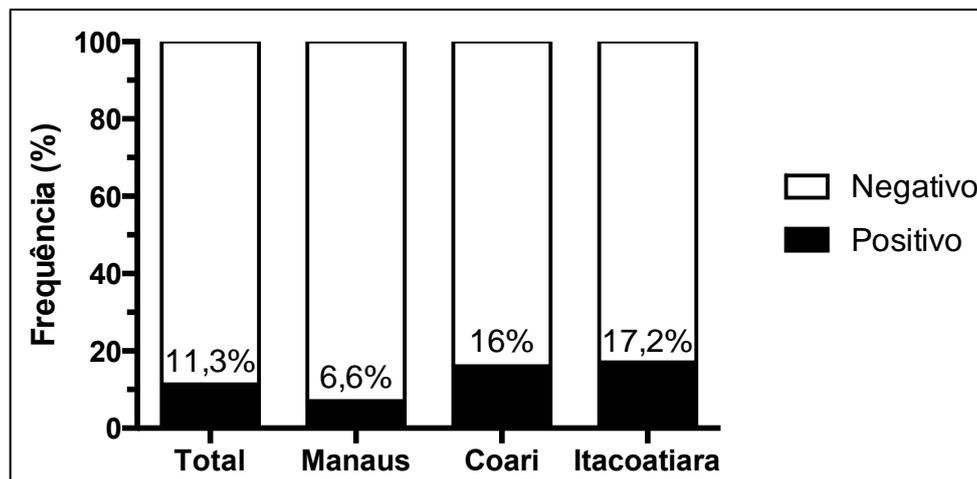


Figura 23. Prevalência de amostras positivas da população total por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para *Hantavírus* segundo município.

Dentre as 625 mulheres participantes do estudo, 85 delas apresentaram anticorpos IgG específicos para *Hantavírus*, com positividade de 13,6%. Enquanto que dos 794 homens, 76 se mostraram positivos (9,6%). Das 161 amostras positivas, a maior porcentagem foi do sexo

feminino, 52,8%, e dos homens, 47,2%, conforme ilustra a tabela 7. Essa diferença foi estatisticamente significante entre os sexos ( $\chi^2$ ;  $p=0,022$ ), cuja maior prevalência para *Hantavírus* ocorreu no sexo feminino [ $p=0,018$ ; OR= 1,5 (IC<sub>95%</sub> 1,1–2,1)].

Sexo	Total N=1419 % (n)	Manaus N=713 % (n)	Coari N=642 % (n)	Itacoatiara N=65 % (n)
Masculino	9,6% (76)	6% (32)	15,7% (33)	17,2% (11)
Feminino	13,6% (85)	8,4% (15)	16,9% (70)	-
TOTAL (n)	161	47	103	11

Tabela 6. Prevalência e números de amostras positivas da população total e entre municípios por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para *Hantavírus* segundo sexo.

A positividade para *Hantavírus* segundo faixa etária dos participantes do inquérito sorológico está descrito na tabela 8 e na Figura 25.

Faixa etária (anos)	N	Prevalência % (n)
18-19	98	8,2% (8)
20-29	450	12,4% (56)
30-39	373	9,4% (35)
40-49	264	11% (29)
50-59	148	12,2% (18)
60-69	50	14% (7)
≥70	22	36,4% (8)
TOTAL	1405	11,35%

Tabela 7. Prevalência e números de amostras positivas da população total por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para *Hantavírus* segundo faixa etária.

Houve significância estatística quando se comparou o prevalência entre as faixas etárias ( $\chi^2$ ;  $p=0,009$ ). Foi evidenciado que o maior número de amostras positivas se enquadrou entre 20 a 29 anos, com 56 indivíduos, entretanto quando se analisa a positividade relativa para *Hantavírus* de um grupo de faixa etária com os demais, nota-se a prevalência significamente aumentada no grupo de 70 anos ou mais [ $p=0,007$ ; OR= 4,6 (IC<sub>95%</sub> 1,9–11,1)]. Além disso, a Figura 25 ilustra que, embora haja um ligeiro pico na faixa entre 20 e 29 anos, há uma relação diretamente proporcional entre a elevação de amostras positivas e o aumento da idade.

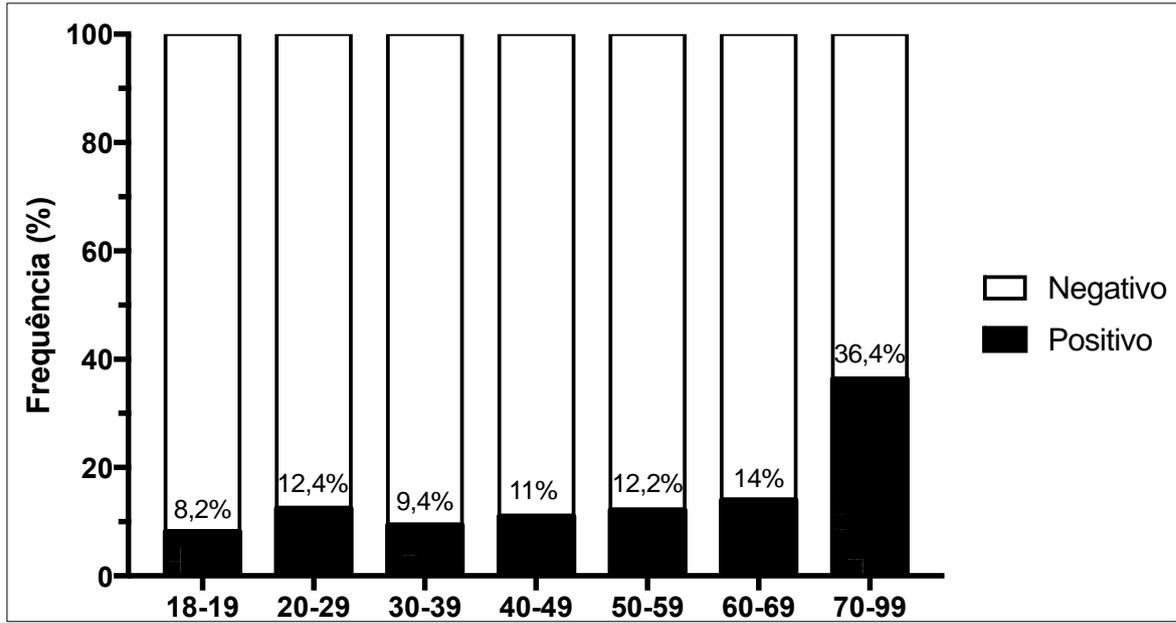


Figura 24. Prevalência de amostras positivas da população total por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para *Hantavírus* segundo faixa etária.

Quando a população foi analisada quanto à renda familiar mensal, medida por salários mínimos – SM (R\$880), constatou-se uma grande concentração de amostras positivas nas menores rendas, conforme mostra a tabela 9. A diferença entre os grupos de rendas mostrou-se estatisticamente significativa ( $\chi^2$ ;  $p < 0,001$ ), e o grupo com até 1 salário mínimo com o maior percentual de positividade (15%), como mostra a Figura 26. Pode-se observar na figura também que em Manaus as amostras positivas foram distribuídas quase similarmente entre os grupos de renda, e em Itacoatiara cujas prevalências no grupo de 3 salários mínimos e a partir de 5 salários pode ser justificada pela amostragem pequena, com 1/3 para 3SM e 1/2 para  $\geq 5$  SM.

Renda familiar mensal	N	Prevalência % (n)
Até 1 SM	612	15% (92)
2 SM	332	6,9% (23)
3 SM	136	7,3% (10)
4 SM	100	12% (12)
$\geq 5$ SM	128	7,9% (10)

Tabela 8. Prevalência e números de amostras positivas da população total por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para *Hantavírus* segundo renda familiar. SM: salário mínimo.

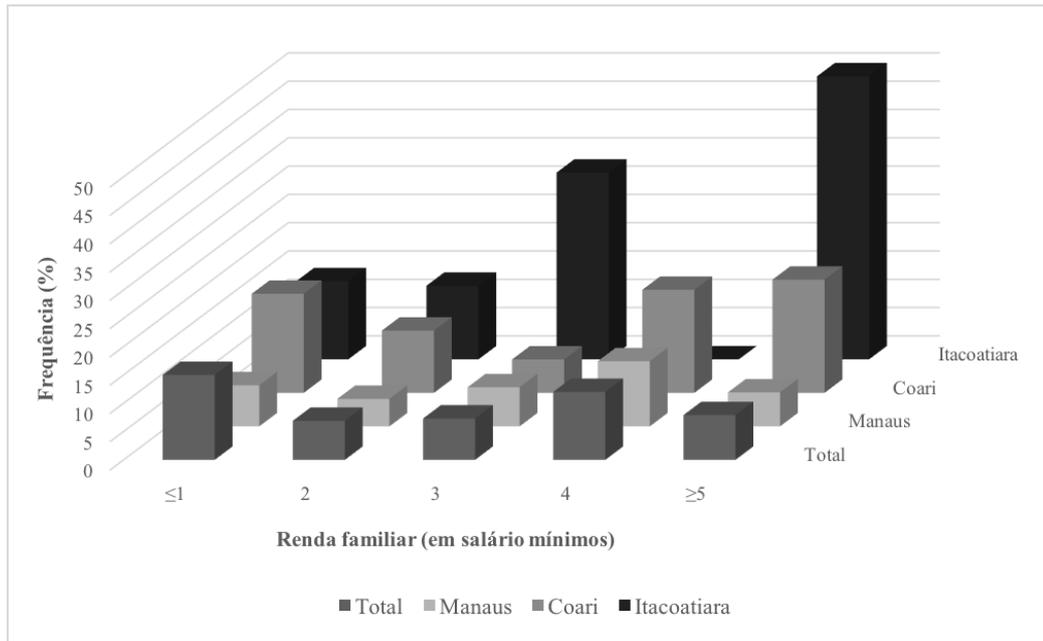


Figura 25. Prevalência de amostras positivas da população total e entre municípios por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para *Hantavírus* segundo renda familiar mensal.

Quanto ao nível de escolaridade, a população total apresentou maior prevalência para *Hantavírus* na classe dos analfabetos (16%), seguida de indivíduos com ensino fundamental incompleto (14,7%) e ensino médio incompleto (14,6%), como mostra a Figura 27. Foi observado que em Manaus as maiores porcentagens ocorrem nas classes com melhor nível de escolaridade apresentando valores de prevalência altos nos níveis de ensino superior incompleto (23,9%) e completo (28,3%). O município de Itacoatiara concentrou-se entre ensino fundamental incompleto a médio completo, com prevalências variando entre 15,4 a 25%. Já Coari revelou valores maiores nas classes mais baixas, desde os analfabetos (16,2%) a médio completo (17%).

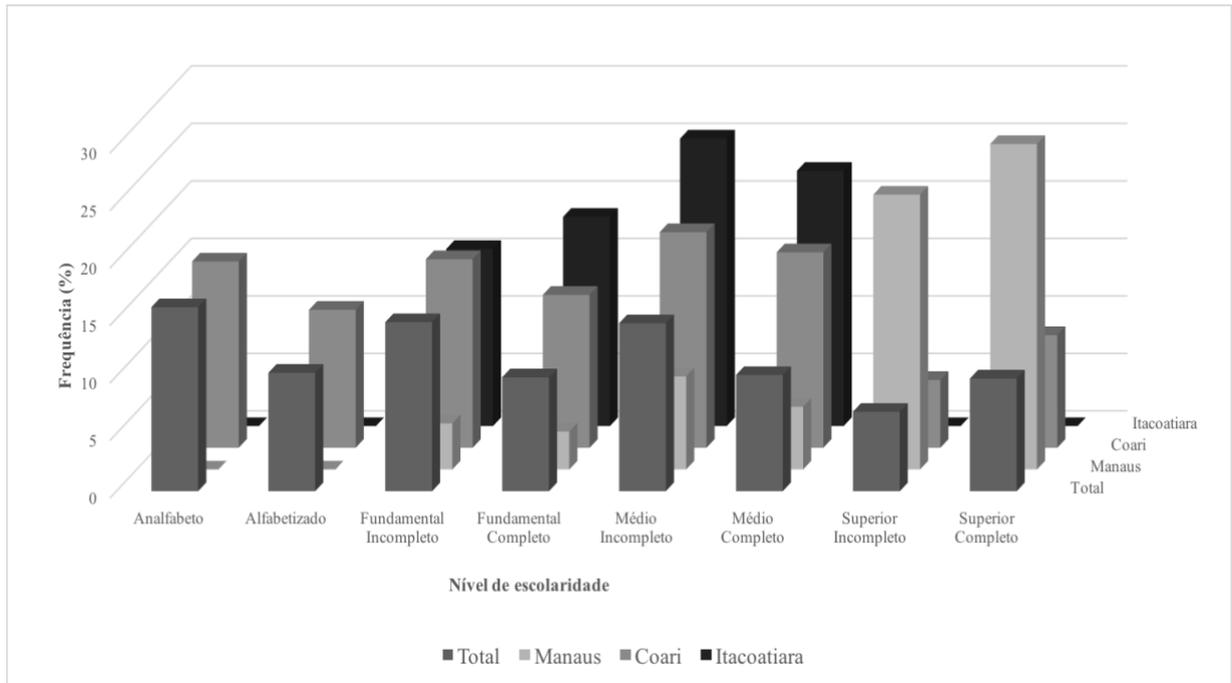


Figura 26. Prevalência de amostras positivas da população total e entre municípios por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para *Hantavírus* segundo nível de escolaridade.

Foi investigado a associação da ocupação com a positividade para *Hantavírus*. Dentre os indivíduos positivos, 30 (19,9%) relataram estar desempregados, outros 30 (19,9%) trabalhadores agropecuários, florestais de caça e de pesca, 22 (14,6%) comerciantes e prestadores de serviços e 17 (11,3%) trabalhadores domésticos, sendo essas ocupações as de maior porcentagem. Não houve significância estatística quando se comparou entre os grupos de ocupações, tanto na população total ( $\chi^2$ ;  $p=0,08$ ), quanto nos municípios de Manaus e Coari, como mostra a tabela 10. O município de Itacoatiara não foi analisado nesse quesito, pois todos os indivíduos são trabalhadores rurais. Aplicou-se uma regressão logística univariada, pelo método *stepwise*, para avaliar a influência das ocupações na prevalência da população total, e o resultado indicou que há associação do trabalho agropecuário e florestal como maior chance para adquirir *Hantavírus* [ $p=0,014$ ; OR= 1,7 (IC<sub>95%</sub> 1,1–2,7)].

Outras características sociodemográficas foram analisadas, mas não apresentaram associação para *Hantavírus* (tabela 25, apêndice D).

Ocupação	Total		Manaus		Coari	
	% (positivos)	(n) (pos/total)	% (positivos)	(n) (pos/total)	% (positivos)	(n) (pos/total)
Desempregado (a)	13,1	(30/229)	4,1	(3/74)	17,4	(27/115)
Altos funcionários de governo ou empresa	5,6	(2/36)	4	(1/25)	10	(1/10)
Profissionais de nível superior	9,6	(9/94)	11	(8/73)	4,8	(1/21)
Profissionais das artes	33,3	(1/3)	33,3	(1/3)	0	(0/0)
Profissionais ou técnicos de nível médio	4,8	(5/105)	5,1	(4/79)	3,8	(1/26)
Serviços administrativos	12,4	(11/89)	7,7	(4/52)	18,9	(7/37)
Prestação de serviços e comerciários	11,1	(22/198)	5,3	(6/113)	18,8	(16/85)
Serviços domésticos	15	(17/113)	0	(0/17)	17,7	(17/96)
Trabalhadores agropecuários, florestais, caça e pesca	16,5	(30/182)	0	(0/3)	16,4	(19/116)
Produção de bens e serviços industriais	11,6	(8/69)	9,5	(6/63)	33,3	(2/6)
Trabalhadores manuais de construção civil	0	(0/39)	0	(0/31)	0	(0/8)
Trabalhadores manuais de reparação e manutenção	4,8	(1/21)	4,8	(1/21)	0	(0/0)
Membro das forças armadas, policiais e bombeiros	8	(6/75)	8,3	(6/72)	0	(0/3)
Ocupações mal especificadas e trabalho informal	7,7	(1/13)	12,5	(1/8)	0	(0/5)
Autônomo	9	(7/78)	6,3	(3/48)	13,3	(4/30)
Estudante	5,9	(1/17)	0	(0/8)	11,1	(1/9)
<b>Valor de <math>p^1</math></b>		<b>p=0,089</b>		<b>p=0,538</b>		<b>p=0,604</b>

Tabela 9. Prevalência e números de amostras positivas da população total e entre municípios por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para *Hantavírus* segundo ocupação. Valor de  $p_1$  = teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ). Pos=amostras positivas

### 5.3.1.2 Possíveis fatores de risco

Em seguida a população total foi investigada quanto a relação da prevalência com possíveis fatores de risco ligados ao contato com área de florestamento e com roedores, bem como dados de saneamento básico. Foi observado que, dentre os positivos, 53,2% relataram ter histórico de trabalho com agricultura, 26,1% mantêm os alimentos da colheita no domicílio, 14,5% possuem depósitos ou galpões de armazenamento de grãos ou celeiros e 34% não possui esgoto em casa, havendo associação estatisticamente significativa apenas nessas atividades, como mostra a tabela abaixo.

Possível fator de risco	Prevalência % (n)	Valor de $p_1$	RP <sub>b</sub> (IC <sub>95%</sub> )
Trabalhou com agricultura	15,8% (84)	<0,001	1,8 (1,3-2,4)
Mantém alimentos da colheita	16,6% (36)	0,007	1,6 (1,2-2,3)
Possui depósito ou galpão de armazenamento de grãos	18,2% (22)	0,017	1,8 (1,1-3,0)
Não possui esgoto	14,2% (53)	0,05	1,4 (1,0-1,8)

Tabela 10. Prevalência e números de amostras positivas da população total por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para *Hantavírus* segundo possíveis fatores de risco. RP<sub>b</sub>: razão de prevalência bruta. Valor de  $p_1$  = teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ).

Outras ações que submetem a população à proximidade a áreas florestadas e atividades ligadas a zona rural não apresentaram relevância estatística com prevalência para *Hantavírus*, bem como comportamentos relacionados ao estreito contato com os vetores roedores e outras condições de saneamento, como possuir água encanada e tratada (tabela 26, apêndice E).

Os participantes do inquérito sorológico também responderam sobre conhecimentos gerais a cerca do tema do trabalho, no caso, se sabiam o que significava o termo “zoonoses” e, curiosamente, dentre os indivíduos positivos, 113 (76,9%) relataram não saber. E esse fator apresentou uma associação significativa para *Hantavírus* ( $\chi^2$ ;  $p=0,014$ ). Na população total do estudo, dos 1.419 indivíduos, 839 relataram não ter ouvido falar sobre *Hantavírus*.

Com esses prévios resultados, foram montados modelos de regressão logística para identificar quais variáveis (preditoras) têm maior influência no desenvolvimento de anticorpos IgG para *Hantavírus* (variável dependente) nos indivíduos participantes desse inquérito. Por conveniência, as variáveis preditoras foram aquelas que exibiram associação significativa nas análises acima e, que quando investigadas por regressão logística univariada pelo método *stepwise* com  $\alpha$  de 5%, apresentaram probabilidade estatística  $p_1 \leq 0,05$ , conforme tabela 12.

Variável Preditora	$p_1$	Odds ratio (OR)	Intervalo de confiança 95%	$p_2$
Município (Coari)	<0,0001	2,7	1,9 – 3,9	<0,0001
Município (Itacoatiara)	0,003	2,9	1,4 – 6,0	<0,0001
Gênero (feminino)	0,018	1,5	1,1 – 2,1	0,018
Faixa etária ( $\geq 70$ anos)	0,0007	4,6	1,9 – 11,1	0,002
Renda familiar (até 1 SM)	<0,001	2,1	1,4 – 2,9	<0,0001
Ocupação (trabalho agropecuário e florestal)	0,013	1,7	1,1 – 2,7	0,018
Trabalhou com agricultura	0,0002	1,9	1,4 – 2,7	0,0002
Mantém alimentos da colheita	0,007	1,8	1,2 – 2,7	0,009
Armazena grãos	0,018	1,8	1,1 – 2,9	0,024
Não possui esgoto	0,05	1,4	1 – 1,8	0,05
Não sabe sobre zoonoses	0,015	1,6	1,1 – 2,5	0,012

Tabela 11. Regressão logística univariada das variáveis preditoras em relação a prevalência para *Hantavírus*.  $P_1$ =Teste de Wald (associação da variável preditora e a dependente);  $p_2$  = nível de significância do modelo. Regressão logística pelo método de *stepwise* com  $\alpha$  de 5%.

Foram, então, montados 2 modelos de regressão logística multivariada a fim de analisar a influência do município na positividade para *Hantavírus*: (a) município, gênero, faixa etária, renda familiar mensal, trabalho com agricultura, manutenção de alimentos da colheita, armazenamento de grãos e saber zoonoses; e (b) gênero, faixa etária, renda familiar mensal, trabalho com agricultura, manutenção de alimentos da colheita, armazenamento de grãos, saber zoonoses, ocupação e possuir esgoto.

Modelos com variáveis preditoras	$p_1$	Odds ratio (OR)	Intervalo de confiança 95%	$p_2$
<b>Modelo (a)</b>				<b>&lt;0,0001</b>
Constant	<b>&lt;0,0001</b>	-	-	
Município (Coari)	<b>&lt;0,0001</b>	<b>3,1</b>	<b>2,0 – 4,7</b>	
Município (Itacoatiara)	<b>0,0012</b>	<b>4,1</b>	<b>1,7 – 9,6</b>	
Gênero (feminino)	0,28	1,3	0,8 – 2,0	
Faixa etária ( ≥ 70 anos)	0,29	1,9	0,6 – 6,5	
Renda familiar	0,44	1,2	0,7 – 2,0	
Trabalhou com agricultura	0,42	1,2	0,7 – 2,0	
Mantém alimentos da colheita	0,39	1,3	0,7 – 2,1	
Armazena grãos	0,65	1,2	0,6 – 2,1	
Não sabe sobre zoonoses	0,94	1,0	0,6 – 1,6	
<b>Modelo (b)</b>				<b>&lt;0,0001</b>
Constant	<b>&lt;0,0001</b>	-	-	
Gênero (feminino)	<b>0,009</b>	<b>1,7</b>	<b>1,1 – 2,6</b>	
Faixa etária ( ≥ 70 anos)	0,22	2,1	0,6 – 7,1	
Renda familiar	0,15	1,4	0,9 – 2,3	
Trabalhou com agricultura	<b>0,009</b>	<b>1,8</b>	<b>1,2 – 2,8</b>	
Mantém alimentos da colheita	0,24	1,4	0,8 – 2,3	
Armazena grãos	0,57	1,2	0,6 – 2,2	
Ocupação (trabalho agropecuário e florestal)	<b>0,02</b>	<b>1,9</b>	<b>1,1 – 3,3</b>	
Não possui esgoto	0,77	1,1	0,7 – 1,7	
Não sabe sobre zoonoses	0,93	1,0	0,6 – 1,6	

Tabela 12. Regressão logística multivariada de 2 modelos para avaliação da influência do município na prevalência.  $p_1$  = Teste de Wald (significância da associação da variável preditora com a variável dependente);  $p_2$  = nível de significância do modelo. Regressão logística pelo método *enter* com  $\alpha$  de 5%. Medidas em negritos estão estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Na tabela 13, pode-se observar no modelo (a) que a principal e única associação encontrada foi a positividade de forma aumentada para *Hantavírus* em relação aos municípios de Coari (OR 3,1; IC<sub>95%</sub> 2,0–4,7) e Itacoatiara (OR 4,1; IC<sub>95%</sub> 1,7–9,6). Em contrapartida, quando não há influência dos municípios, as principais variáveis associativas que surgem são: gênero feminino (OR 1,7; IC<sub>95%</sub> 1,1–2,6), trabalho com agricultura (OR 1,8; IC<sub>95%</sub> 1,2–2,8) e trabalho agropecuário e florestal (OR 1,9; IC<sub>95%</sub> 1,1–3,3).

### 5.3.2 Análise da prevalência para *Hantavírus* nas populações de acordo com sexo

Dos 794 homens participantes do estudo, 76 (9,6%) apresentaram anticorpos IgG

específicos para *Hantavírus*. Destes, 32 (42,1%) foram doadores de sangue de Manaus, 33 (43,4%) de Coari e 11 (14,5%) trabalhadores rurais de Itacoatiara. Comparando a positividade entre municípios, houve uma diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2$ ;  $p < 0,001$ ), tendo percentuais de positividade de 5,98% em Manaus, 16,9% em Coari e 17,2% em Itacoatiara.

Quando analisados por faixa etária (tabela 14), foi observado uma significância estatística entre os grupos ( $\chi^2$ ;  $p < 0,001$ ), e comparando cada uma das faixas etárias com as demais, verificou-se um aumento significativo na faixa a partir dos 70 anos, com percentual de positividade de 50% [ $p = 0,002$ ; OR=11 (IC<sub>95%</sub> 2,4-50,5)].

Faixa etária (anos)	Masculino % (n/total)	Feminino % (n/total)	Total % (n/total)
18-19	8,3% (4/48)	8% (4/50)	8,2% (8/98)
20-29	10,5% (27/258)	15,1% (29/192)	12,4% (56/450)
30-39	7,7% (17/221)	11,8% (18/152)	9,4% (35/373)
40-49	8,7% (13/150)	14% (16/114)	11% (29/264)
50-59	7,9% (6/76)	16,7% (12/72)	12,2% (18/148)
60-69	15% (3/20)	13,3% (4/30)	14% (7/50)
≥70	50% (6/12)	20% (2/10)	36,4% (8/22)
<b>Valor de <math>p^1</math></b>	<b><math>p &lt; 0,0001</math></b>	<b><math>p = 0,806</math></b>	<b><math>p = 0,009</math></b>

Tabela 13. Prevalência e números de amostras positivas da população total por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para *Hantavírus* segundo sexo e faixa etária. Valor de  $p_1$  = teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ). Medidas em negritos estão estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Sobre as ocupações, foi observado uma associação significativa entre os grupos ( $\chi^2$ ;  $p = 0,05$ ), tendo a maior porcentagem dos positivos no trabalho agropecuário e florestal (25%). Analisou-se também a positividade para *Hantavírus* quanto a fatores relacionados a contato com área de florestamento e roedores, bem como saneamento básico. Dentre os positivos, os principais fatores encontrados foram: participar de desmatamento, trabalhar com agricultura e não possuir rede de esgoto, cuja associação foi estatisticamente significativa, como mostra a tabela 15. Outros acontecimentos estudados no inquérito sorológico não apresentaram relevância estatística, embora cerca de 60% dos positivos tenham relatado ter tido contato

recente com área de florestamento. Com relação a contato com roedores, 30% informaram ter matado ou capturado roedores, 23,5% comeram carne de roedor e 56,1% observaram a presença de roedor em casa ou no trabalho.

Possível fator de risco	Prevalência % (n)	Valor de $p_1$
Participou de desmatamento	14% (25)	<b>0,023</b>
Trabalhou com agricultura	15,3% (39)	<b>&lt;0,001</b>
Não possui esgoto	13,4% (25)	<b>0,043</b>
Visitou ou teve contato com floresta	10,2% (45)	0,465
Matou ou capturou roedores	11,6% (20)	0,275
Comeu carne de roedores	10,5% (16)	0,712
Observou presença de roedor em casa/trabalho	9,6% (37)	0,981

Tabela 14. Prevalência e números de amostras positivas de homens por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para *Hantavírus* segundo possíveis fatores de risco. RP<sub>b</sub>: razão de prevalência bruta. Valor de  $p_1$ =teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ).

Dentre as 625 mulheres desse inquérito sorológico, 85 se mostraram positivas para *Hantavírus* com positividade de 13,6%. Destas, 15 (17,65%) foram doadoras de sangue de Manaus e 70 (82,35%) da população geral de Coari. O teste de  $\chi^2$  mostrou que houve significância estatística quando se comparou o percentual de positividade entre os municípios ( $p=0,017$ ), sendo 8,43% em Manaus e 15,7% em Coari.

Todos os outros fatores analisados nesse estudo como faixa etária, ocupação, renda, e aqueles relacionados a proximidade à área de florestamento, contato com roedores, saneamento básico, entre outros, não apresentaram associação estatisticamente significativa. Contudo destaca-se que, dentre as mulheres positivas, 79,2% recebem até 1 SM, 47% tiveram contato recente com área florestada, 53,6% trabalham com agricultura, 34,3% mantêm alimentos da colheita, 57,1% possuem hortas ou árvores frutíferas ao redor da casa, 67,1% relataram a presença de roedores na residência ou local de trabalho, além do maior percentual de positividade ter sido na classe etária mais velha, a partir dos 70 anos (20%) (tabela 14).

### 5.3.3 Análise da prevalência para *Hantavírus* nas populações de acordo com município

Em Manaus, das 713 amostras analisadas, 47 (6,6%) apresentaram anticorpos IgG específicos para *Hantavírus*. Dessas 47, 15 eram do sexo feminino e 32 do sexo masculino. Não houve diferença estatística entre os gêneros ( $\chi^2$ ;  $p=0,25$ ), entretanto o maior percentual de positividade ocorreu no sexo feminino com 8,4%, em relação a 6% do sexo masculino. Por faixa etária, com média de idade de 33,3 anos, mediana de 32 anos e intervalo de 18 a 65 anos, o maior percentual ocorreu entre 50 a 59 anos (10,6%).

O fato de possuir galpão ou depósito para armazenamento de grãos se apresentou estatisticamente significativo ( $\chi^2$ ;  $p=0,04$ ), com um percentual de positividade de 18,75%. Outro fator que exibiu uma associação com significância estatística foi zona ( $\chi^2$ ;  $p=0,026$ ), observando-se uma positividade significativamente aumentada na zona centro-sul [ $p=0,003$ ; OR=4,5 (IC<sub>95%</sub> 1,7-12,5)], conforme tabela 16.

Zona	N	Prevalência % (n)
Norte	232	4,3% (10)
Sul	117	4,3% (5)
Leste	98	9,2% (9)
Oeste	129	7,7% (10)
Centro-oeste	88	5,7% (5)
Centro-sul	47	17% (8)
TOTAL	711	6,6% (47)

Tabela 15. Prevalência e números de amostras positivas da população do município de Manaus por ELISA indireto-IgG e confirmadas por DotBlot para *Hantavírus* segundo zona.

Em Coari, dos 642 indivíduos analisados, 103 (16%) se mostraram positivos para *Hantavírus*. Desses, 70 eram do sexo feminino e 33 do sexo masculino. Não houve diferença estatística entre os gêneros ( $\chi^2$ ;  $p=0,68$ ), entretanto o maior percentual de positividade ocorreu no sexo feminino com 16,9%, em relação a 15,6% do sexo masculino. Por faixa etária, com média de idade de 38,7 anos, mediana de 36 anos e intervalo de 18 a 95 anos, o maior percentual ocorreu na faixa de idade igual ou maior que 70 anos (36,4%).

Nenhum dos fatores estudados nesse inquérito sorológico apresentaram alguma associação estatisticamente significativa dentro do município de Coari. Entretanto, destaca-se que, dentre as amostras positivas, 84,8% recebem até 1 SM, 54% tiveram contato recente com área florestadas, 67,3% trabalham com agricultura, 34,6% mantêm alimentos da colheita, 41% não possuem rede de esgoto, 75,3% relataram a presença de roedores na residência ou local de trabalho e 45,9% comem carne de roedor.

Em Itacoatiara, dos 65 trabalhadores rurais, 11 (17,2%) foram positivos para infecção por *Hantavírus*. Todos são do sexo masculino e entram em contato constantemente com áreas florestadas devido a ocupação extrativista em uma madeireira do município. Por faixa etária, com média de idade de 33,4 anos, mediana de 30 anos e intervalo de 19 a 59 anos, os maiores percentuais ocorreram entre 20 e 29 anos (n=6; 54,5%) e entre 40 e 49 anos (n=4; 36,4%).

Embora se trate de uma amostragem pequena e muito homogênea, dentre os 11 indivíduos positivos, 7 recebem até 2 SMs, 7 não possuem rede de esgoto em casa, 8 possuem plantações ou árvores frutíferas ao redor da casa, 7 relataram a presença de roedores na residência ou local de trabalho, 3 mataram ou capturaram roedor e 4 foram mordidos por roedor.

#### 5.3.4 Comparação de fatores entre amostras positivas dos municípios de Manaus e Coari

Foi realizada uma análise entre os indivíduos positivos para *Hantavírus* das populações de Manaus (n=47) e Coari (n=103), para investigar e estimar possíveis fatores de risco vinculados aos municípios, excluindo Itacoatiara pelo tamanho e homogeneidade da amostragem (todos do sexo masculino com contínua atividade rural e contato em área florestal).

Comparando os municípios por escolaridade, houve uma diferença significativa ( $\chi^2$ ;  $p < 0,0001$ ), em que a prevalência em Manaus concentrou-se nos grupos com melhor nível (ensino médio para adiante), enquanto Coari nos menores (analfabetos a ensino fundamental incompleto). Referente à renda, Manaus manteve a positividade distribuída entre os grupos,

diferentemente de Coari que aglomerou nos grupos de baixa renda (cerca de 85% com até 1 SM e 9,8% com 2 SM), sendo essa associação estatisticamente significativa ( $\chi^2$ ;  $p < 0,0001$ ). Quanto à ocupação, apresentou-se uma diferença entre os municípios ( $\chi^2$ ;  $p < 0,0001$ ), em que profissionais de nível superior foi a maior porcentagem em Manaus (18,2%), e desempregados e trabalhadores agropecuários/florestais em Coari (28,1 e 19,8%, respectivamente).

Algumas ações comportamentais relacionadas a contato com roedores, atividades em imediações de áreas de florestamento e propriedades de saneamento básico apresentaram significância estatística comparando os municípios, conforme ilustra a tabela 18. Ressalta-se que essa avaliação mostra as principais características mais presentes nos indivíduos soropositivos do município de Coari em relação a Manaus.

Com o propósito de investigar mais profundamente a influência de cada fator na prevalência dentre os municípios, realizou-se uma regressão logística univariada, com método *stepwise* com  $\alpha$  de 5%, entre as variáveis dicotômicas que apresentaram significância estatística no teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) da tabela 18. Fatores como observar a presença de roedores na residência ou trabalho [ $p=0,024$ ; OR=6,5 (IC<sub>95%</sub> 1,3-32,7)] e trabalho com agricultura [ $p=0,009$ ; OR=10,1 (IC<sub>95%</sub> 1,8-56,9)] apresentam associação com a positividade no modelo ( $p=0,039$ ).

Com os resultados desse modelo univariável preliminar e agregado a fatores estudados na tabela 12 acima citada, elaborou-se quatro modelos de regressão logística multivariada para avaliar as variáveis preditoras com maior influência na prevalência entre os municípios: (1) gênero, renda, trabalho com agricultura, alimentos da colheita, armazenamento de grãos, presença de roedores em casa/trabalho, não saber zoonoses e não possuir esgoto; (2) gênero, renda, trabalho com agricultura, presença de roedores em casa/trabalho e não possuir esgoto; (3) gênero, renda, trabalho com agricultura, presença de roedores em casa/trabalho; (4) gênero, trabalho com agricultura, presença de roedores em casa/trabalho e não possuir esgoto.

Os resultados dos modelos de regressão logística, mostrados na tabela 17, indicam que

o gênero feminino, trabalho com agricultura, renda familiar mensal mínima, presença de sinais de roedores na residência ou trabalho e não possuir rede de esgoto na moradia são fatores que têm associação com prevalência para *Hantavírus*, principalmente no município de Coari.

Variáveis Predictoras	$p_1$	Odds ratio (OR)	Intervalo de confiança 95%	$p_2$
<b>Modelo 1</b>				<b>&lt;0,0001</b>
Constant	<b>0,019</b>	-	-	
Gênero (feminino)	0,479	1,6	0,4 – 6,1	
Renda familiar (até 1 SM)	<b>0,001</b>	<b>14,9</b>	<b>2,9 – 75,5</b>	
Trabalhou com agricultura	<b>0,009</b>	<b>5,8</b>	<b>1,5 – 22,1</b>	
Mantém alimentos da colheita	0,257	2,9	0,4 – 19	
Armazena grãos	0,958	0,94	0,1 – 6,9	
Observou presença de roedor	<b>0,015</b>	<b>4,9</b>	<b>1,3 – 17,8</b>	
Não sabe sobre zoonoses	0,367	0,5	0,1 – 2,3	
Não possui esgoto	0,772	1,3	0,2 – 7,5	
<b>Modelo 2</b>				<b>&lt;0,0001</b>
Constant	<b>&lt;0,0001</b>	-	-	
Gênero (feminino)	0,057	3,1	0,97 – 10,1	
Renda familiar (até 1 SM)	<b>0,002</b>	<b>7,5</b>	<b>2,1 – 26,2</b>	
Trabalhou com agricultura	<b>&lt;0,0001</b>	<b>9</b>	<b>2,7 – 30,2</b>	
Observou presença de roedor	<b>0,003</b>	<b>5,7</b>	<b>1,8 – 18,1</b>	
Não possui esgoto	0,515	1,7	0,4 – 8,1	
<b>Modelo 3</b>				<b>&lt;0,0001</b>
Constant	<b>&lt;0,0001</b>	-	-	
Gênero (feminino)	<b>0,002</b>	<b>5,4</b>	<b>1,9 – 15,2</b>	
Trabalhou com agricultura	<b>&lt;0,0001</b>	<b>11,2</b>	<b>3,7 – 33,9</b>	
Observou presença de roedor	<b>&lt;0,0001</b>	<b>7,9</b>	<b>2,8 – 22,4</b>	
Não possui esgoto	<b>0,034</b>	<b>4,3</b>	<b>1,1 – 16,4</b>	
<b>Modelo 4</b>				<b>&lt;0,0001</b>
Constant	<b>&lt;0,0001</b>	-	-	
Gênero (feminino)	<b>0,050</b>	<b>3,2</b>	<b>1,0 – 10</b>	
Renda familiar (até 1 SM)	<b>&lt;0,0001</b>	<b>9,6</b>	<b>3,1 – 29,4</b>	
Trabalhou com agricultura	<b>&lt;0,0001</b>	<b>8,8</b>	<b>2,7 – 28,7</b>	
Observou presença de roedor	<b>0,004</b>	<b>5,2</b>	<b>1,7 – 15,8</b>	

Tabela 16. Regressão logística multivariada de 4 modelos para avaliar as variáveis com maior influência na prevalência para *Hantavírus* entre os municípios de Manaus e Coari.  $p_1$  = Teste de Log Likelihood – máxima verossimilhança/probabilidade (significância da associação da variável preditora com a variável dependente);  $p_2$  = nível de significância do modelo. Regressão logística pelo método de *enter* com  $\alpha$  de 5%. Medidas em negritos estão estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Possíveis fatores de risco	Manaus		Coari		Valor de p <sup>1</sup>	RP <sub>b</sub> (IC 95%)
	%	n	%	n		
<b>Relacionado a roedores</b>						
Costuma caçar animais	7	3	19,6	19	0,059	1,3 (1,0-1,6)
Matou ou capturou roedores	18,2	8	31,3	30	0,107	1,2 (0,9-1,5)
Observou a presença de roedores na residência e/ou trabalho	30,2	13	75,3	70	<b>&lt;0,0001</b>	<b>7 (3,1-15,7)</b>
Foi mordido por roedor ou outro animal	4,4	2	25	24	<b>0,003</b>	<b>1,5 (1,2-1,8)</b>
Comeu carne de roedor	0	0	45,9	45	<b>&lt;0,0001</b>	<b>1,8 (1,5-2,2)</b>
<b>Relacionado a proximidade a área de florestamento</b>						
Visitou ou teve contato com floresta	41,3	19	54	54	0,154	1,2 (0,9-1,5)
Costuma visitar fazenda ou chácara	30,4	14	37,6	38	0,39	1,1 (0,88-1,4)
Costuma tomar banho em locais abertos ou rios	26,9	12	49,5	50	<b>0,008</b>	<b>1,3 (1,1-1,7)</b>
Costuma fazer passeios ou acampamentos em áreas florestadas	8,7	4	24,7	25	<b>0,023</b>	<b>1,3 (1,1-1,6)</b>
Tem gramado em volta da casa	15,6	7	31,2	25	0,054	1,3 (1,0-1,7)
Tem hortas, plantações ou árvores frutíferas em volta da casa	34,8	16	53,5	54	<b>0,035</b>	<b>1,3 (1,0-1,6)</b>
Mora perto de floresta ou fragmento de floresta	26,7	12	41,8	41	0,082	1,2 (0,9-1,5)
Mora ou trabalha perto de área de criação de animais	0	0	25,5	25	<b>&lt;0,001</b>	<b>1,6 (1,4-1,8)</b>
Participou de desmatamento	6,5	3	21,6	21	<b>0,024</b>	<b>1,4 (1,1-1,7)</b>
Trabalhou com agricultura	19,6	9	67,3	68	<b>&lt;0,0001</b>	<b>8,5 (3,6-19,6)</b>
Mantém alimentos da colheita	8,7	4	34,6	28	<b>0,001</b>	<b>1,6 (1,2-1,9)</b>
Possui depósito ou galpão para armazenamento de grãos	7	3	18,4	18	0,08	1,3 (1,0-1,6)
<b>Relacionado a saneamento básico</b>						
Não possui água encanada ou tratada em casa	2,2	1	26	26	<b>&lt;0,001</b>	<b>1,5 (1,3-1,8)</b>
Não possui rede de esgoto em casa	11,1	5	41	41	<b>&lt;0,001</b>	<b>5,5 (2-15,3)</b>

Tabela 17. Prevalência e número de amostras positivas para *Hantavírus* entre os municípios de Manaus e Coari segundo fatores relacionados a contato com roedores, proximidade a área de florestamento e saneamento básico. p<sub>1</sub>= teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ). RP<sub>b</sub> = razão de prevalência bruta. IC 95% = Intervalo de Confiança 95%. Medidas em negrito estão estatisticamente significativas (p $\leq$ 0,05).

## 6 DISCUSSÃO

Hantavirose é uma antropozoonose emergente de grande importância para saúde pública mundial. É uma doença que causa um impacto significativo em populações devido a alta gravidade e letalidade dos casos (CORDOVA & FIGUEIREDO, 2014). Entretanto, sugere-se que haja ocorrências de infecção por *Hantavírus* com quadros benignos e/ou assintomáticos.

Em virtude da complexidade da biodiversidade amazônica e do amplo espaço territorial, é prudente desenvolver estudos para investigar a circulação do *Hantavírus* nas diversas regiões e vincular o agravo de cada localização à dinâmica do espaço amazônico. Os solos ricos em matéria orgânica vegetal favorecem atividades ocupacionais e de exploração, especialmente nos estados do Pará e Mato Grosso, onde ocorrem o maior número de casos na Amazônia Legal (SANTOS et al., 2012). Entretanto, uma vez que o estado do Amazonas integra uma região mais conservada com atividades extrativistas mais intensas em municípios do interior e em menor proporção na capital, é fundamental entender a distribuição geográfica desse vírus.

Baseado nessa ideia, foi proposto investigar preliminarmente a epidemiologia em municípios ainda não estudados do estado do Amazonas com amostras de população com acessibilidade à serviços públicos de saúde de Manaus e Coari, além de pequeno grupo de trabalhadores rurais de Itacoatiara. Anteriormente, um estudo realizado no Amazonas por Gimaque et al. (2012) analisou a prevalência em quatro municípios de três regiões do estado e encontrou taxas de 0,2% a 0,9%. Para tanto, decidimos aprofundar e ampliar o inquérito sorológico no estado por meio da determinação de anticorpos para *Hantavírus* e associar com características sociais, demográficas, econômicas, comportamentos de proximidade a áreas florestadas, atividades que estreitam a interação com os vetores roedores, além de dados de saneamento básico.

Esse estudo epidemiológico contou com indivíduos adultos a partir dos 18 anos de idade, faixa essa com intensa atividade física laboral, que buscaram locais de serviço de saúde dos municípios. Há o reconhecimento que a amostragem não-aleatória e de conveniência, utilizada nesse inquérito, apresenta validade limitada para descrever a frequência de uma doença e estender as características para a população geral. Entretanto o conteúdo não deixa de ser válido para uma estimativa, associação de exposições e melhor compreensão da dinâmica e manutenção do *Hantavírus* na região. Justificamos essa decisão por facilitar a operacionalidade de abordagem à população participante desse estudo.

O desenvolvimento da pesquisa intercorreu-se com análises das amostras coletadas por ELISA na determinação de anticorpos IgG contra o antígeno recombinante produzido nesse trabalho, denominado proteína N\_AM\_Hanta, o qual se mostrou, em análises filogenéticas, proximamente relacionado a cepas de *Hantavírus* Andes, majoritária e prevalente na América da Sul, e outras espécies pertencentes ao clã *Andes*, e secundariamente relacionado aos vírus *Rio Mamoré* e *Laguna Negra*, influentes na Região Amazônica. No Brasil, a maioria dos inquéritos sorológicos para *Hantavírus* utilizaram para detecção de anticorpos IgG o teste de ELISA, entretanto, em sua maioria, utilizando antígenos do vírus *Araraquara* (LIMONGI et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2010; BADRA et al., 2012; GIMAQUE et al., 2012; SANTOS et al., 2013; CORDOVA & FIGUEIREDO, 2014; VIEIRA et al., 2016; MORAIS et al., 2016), enquanto outros fazendo uso do vírus argentino *Andes* (CAMPOS et al., 2003; MEDEIROS et al., 2010).

Com a análise de alguns estudos epidemiológicos, verificou-se que a prevalência de anticorpos anti-*Hantavírus* pode variar, especialmente ser subestimada, de acordo com a proteína N recombinante utilizada como antígeno nas metodologias empregadas e o local do inquérito. Um exemplo notório referente a essa constatação, foi um estudo realizado por Holmes et al. (2000) que determinou a prevalência de infecção por *Hantavírus* no município de

Jardinópolis (SP) em 1,23%, utilizando como antígeno a proteína N do vírus norte-americano *Sin nombre* (CDC, EUA). Anos depois, Campos et al. (2003), no mesmo município, sugeriu que utilizando o antígeno N do vírus *Andes* (PADULA et al., 2000), da região sul-americana, aumentaria a sensibilidade do teste sorológico. Ao final, evidenciou uma soroprevalência de 14,3%, ou seja, cerca de 12 vezes mais que o achado anterior. Um outro estudo desenvolvido por Amada et al. (2014) testou *strips* de imunocromatografia baseado em antígenos de nucleocapsídeos truncados de três *Hantavírus* representativos e encontrou que a combinação desses antígenos tem a capacidade de detectar anticorpos anti-*Hantavírus* com maior sensibilidade.

Witkowski et al. (2015) conduziu um inquérito sorológico em vilas de floresta tropical na África e realizou a triagem de 982 amostras com ELISAs utilizando nucleocapsídeos recombinantes dos vírus *Dobrava-Belgrade*, *Puumala* e *Sangassou* africano. Foi detectado 229 amostras positivas para vírus *Sangassou* e apenas 28 contra o vírus *Puumala*. Com base no conhecimento prévio que a espécie *Sangassou* é a responsável pelas infecções por *Hantavírus* na região africana, a soroprevalência foi subestimada quando se utilizou como antígeno a proteína recombinante do vírus *Puumala*. Em um estudo sobre reação cruzada, Elgh et al. (1998) comparou a reatividade dos anticorpos contra o vírus *Puumala* em comparação aos vírus *Hantaan*, *Seoul*, *Dobrava* e *Sin nombre*, em amostras de pacientes com Nefropatia Epidêmica. Foi demonstrado que nesses pacientes houve um aumento significativo de anticorpos IgG reagindo cruzadamente em função do tempo, ou seja, depois do início da doença, aumenta-se gradativamente o nível de reação cruzada dos anticorpos IgG contra o vírus *Puumala*. Em adição, notou-se um forte cruzamento com a proteína N do vírus *Sin nombre* e uma reatividade menos pronunciada com as proteínas derivadas dos vírus *Hantaan*, *Seoul* e *Dobrava*. Esse achado mostra a interferência considerável da reação cruzada na interpretação de dados sorológicos para *Hantavírus* em estudos com intuito soropidemiológico.

Esses relatos citados anteriormente fundamentam a hipótese de que dados de soroprevalência para *Hantavírus* podem variar em função do antígeno e o local da pesquisa. Em suma, a utilização de um antígeno da espécie predominante na região de estudo torna o ensaio mais sensível e, conseqüentemente, amplia a estimativa de prevalência, atingindo o maior grau de realidade possível. Por isso, acreditamos que o uso do antígeno N\_AM\_Hanta, produzido nesse estudo com sequências de espécies encontradas na região do Amazonas, pôde aumentar a sensibilidade do teste. Foi realizada uma padronização no método de ELISA com reprodutibilidade alcançada pela repetição e confirmação dos soros positivo e negativo.

Dentre os 1419 participantes neste trabalho, a prevalência foi de 11,35%, ou seja, 161 amostras apresentaram anticorpos IgG para o *Hantavírus* N\_AM\_Hanta. Dessas, 47 foram encontradas em Manaus, 103 em Coari e 11 em trabalhadores rurais de Itacoatiara, com prevalências relativas de 6,6%, 16% e 17,2%, respectivamente. Esses valores de positividade são relativamente altos e não são comumente encontrados em inquéritos sorológicos. No Brasil, três estudos reportaram números similares. Um deles foi realizado por Campos et al. (2003), focando em uma população entre 15 e 70 anos, com base no conhecimento prévio de que a SCPH acomete adultos em fase de plenitude física e de trabalho, encontrou, dentre 818 habitantes do município de Jardinópolis, localidade da região de Ribeirão Preto (SP), 117 (14,3%) soropositivos contra o antígeno N do vírus *Andes* argentino. Outro estudo foi executado por Santos et al. (2013), em um assentamento rural de 540 habitantes no município de Marcelândia, do estado do Mato Grosso e pertencente a Amazônia Legal, em que 7 indivíduos de 54 trabalhadores rurais se mostraram positivos contra o antígeno N do vírus *Araraquara* (soropositividade de 13%). O terceiro é um recente estudo desenvolvido por Vieira et al. (2016), também em Mato Grosso, no município de Sinop, referenciado como uma zona de transição geográfica entre os biomas savana e floresta tropical. Nele, 198 amostras de pacientes exibiram doença febril aguda e diagnóstico clínico-epidemiológico para dengue, entretanto 70% dessas

amostras, quando testadas, não foram positivas para dengue ou outras arboviroses. Das 198 amostras, 27 (13,6%) apresentaram anticorpos anti-*Hantavírus*. Em ambos os estudos de MT, o antígeno N utilizado nos testes de ELISA foi o do vírus *Araraquara* (FIGUEIREDO et al., 2008, 2009)

Outros dois inquéritos com altas taxas de prevalência foram realizados no Paraguai, na região de planície semi-árida de Gran Chaco que, por sua vez, revelou a mais alta prevalência de infecções por *Hantavírus* nas Américas, utilizando o antígeno N do vírus *Sin Nombre* nos testes de ELISA. O primeiro estudo investigou casos suspeitos de hantavirose, indivíduos que contactaram esses pacientes e membros da mesma comunidade, observando 14,8% entre os contactantes e 12,8% entre os membros da comunidade (WILLIAMS et al., 1997). O outro estudo pesquisou 551 indígenas, 140 descendentes de germânicos e 21 procedentes de espanhóis e encontrou uma soroprevalência global de 42,7% (45,2% para indígenas e 34,2% para não-indígenas) (FERRER et al., 2003).

Nosso estudo envolvendo doadores de sangue em Manaus, com positividade de 6,6%, apresentou valor similar a outra análise realizada por Cordova e Figueiredo (2014) com doadores de municípios que cobriram geograficamente todo o território do estado de Santa Catarina, o qual apresentou soropositividade global de 4,4% (14/314 indivíduos), taxa de 6% na capital de Florianópolis e variação de 2,8% a 8% entre os municípios adjacentes. Considerando que os doadores de sangue são indivíduos teoricamente saudáveis, reforça-se a suspeita de que os *Hantavírus* podem estar causando infecções inaparentes e atípicas, de forma assintomática ou oligossintomática não-específica, elevando o número de casos subnotificados, além de que mais de um tipo de *Hantavírus* pode estar circulando na região, os quais podem acarretar infecção benignas ou até mesmo representarem espécies não-patogênicas.

Ressalta-se a ideia de que em áreas endêmicas de dengue, como no caso de Manaus e os outros 2 municípios, pacientes com febre provocada por outras arboviroses e até mesmo

hantavirose são, em sua maioria, diagnosticadas equivocadamente como dengue baseado em dados clínico-epidemiológicos (VIEIRA et al., 2016). Corrobora-se essa hipótese com um estudo feito por Lima et al. (2011) no estado do Ceará com a investigação de 72 amostras de pacientes, com histórico de febre aguda, provenientes do surto de dengue ocorrido na região em 2008. Dessas, 1 (1,4%) apresentou anticorpos IgM e 2 (2,8%) apresentaram anticorpos IgG contra o antígeno N do vírus *Araraquara*, sendo que um desses pacientes com IgG anti-*Hantavírus* também apresentou anticorpos IgM anti-dengue. Esses três pacientes residiam em área urbana. Assim pôde ser ratificado que infecções virais, especialmente aquelas com perfil de síndrome febril aguda, como hantavirose, podem estar sendo erroneamente diagnosticadas como dengue. Esse fato demonstra um alerta para a melhoria da vigilância epidemiológica e emprego de métodos de diagnóstico diferencial rápidos e sensíveis.

Quanto à faixa etária, foi verificado que o estrato entre 20 e 29 anos representou a maior porcentagem entre os positivos, possivelmente devido ao grande número de participantes dessa faixa envolvidos no estudo. Contudo, pôde-se observar uma relação diretamente proporcional entre positividade para *Hantavírus* e o aumento gradativo da idade. Esse achado coincide com o estudo de Limongi et al. (2009), em que entre 400 indivíduos de 12 a 76 anos, a soropositividade foi observada apenas na faixa acima de 39 anos, sugerindo que esse evento de alto risco está ligado ao histórico de maior tempo de exposição na classe etária mais velha, especialmente durante suas atividades ocupacionais, como outros autores mencionaram (YOUNG et al., 2000). Enfatiza-se a hipótese de que a partir dos 20 anos de idade, o indivíduo está em condição integral com intensa produtividade laboral, o que permite maior probabilidade de infecção por *Hantavírus* no ambiente de trabalho, bem como maior interação com locais susceptíveis durante atividades de lazer, como pescarias e visitas em fazendas e chácaras. Esse fato é corroborado com o estudo de Mendes et al., (2010) que observou associação na

positividade para *Hantavírus* com idade acima de 20 anos, mas esse fator foi explicado pela ocupação do trabalho agrícola em modelo de regressão logística ajustado para idade.

Observamos diferença significativa na prevalência de infecção por *Hantavírus* entre homens e mulheres participantes desse estudo, em que o sexo feminino foi predominante na taxa de positividade (13,6%). Fato esse que pode ser corroborado com dois recentes trabalhos. Primeiro com o de Vieira et al. (2016) que encontrou uma porcentagem de 77,7% para as mulheres dentre os indivíduos positivos, com prevalência de 20% e 3,5 vezes maior risco de infecção para o sexo feminino. Enquanto que Morais et al. (2016) evidenciou 60,9% de mulheres positivas dentre os soropositivos, com prevalências maiores em relação ao sexo masculino em três dos quatro municípios abrangidos. Os nossos achados juntamente com esses 2 estudos foram de contra a maioria dos inquéritos sorológicos cujas maiores proporções de positividade para *Hantavírus* foram observadas no sexo masculino.

Sugere-se que essa maior prevalência no sexo feminino está associada às ocupações. Considerando que as ocupações mais determinantes entre os positivos nesse estudo foram trabalho agropecuário, comerciários/prestadores de serviços e domésticos, esse último em maior número entre as mulheres positivas, insinua-se que atividades que envolvem a dispersão de aerossóis e dejetos, como limpeza de ambiente domiciliares, podem ser uma das principais formas de contaminação para essas mulheres (MUÑOZ-ZANZI et al., 2015; VIEIRA et al., 2016). Ao contrário do sexo masculino que foi associado significativamente com trabalho agrícola e desmatamento, como observado por Figueiredo et al., 2014, e maiores evidências na classe acima de 60 anos, também identificado em Muñoz-Zanzi et al. (2015).

Em relação ao nível econômico, foi observado que as menores rendas estão associadas significativamente com positividade para *Hantavírus*. Torres-Morales (2000) sugeriu em seu trabalho que o baixo nível socioeconômico está diretamente interligado à existência de maior número de infecções humanas por *Hantavírus*.

Ao contrário do esperado, não foi observado associação de infecção por *Hantavírus* e fatores ligados a contato com roedores na população total do estudo. Esse achado foi encontrado no estudo de Vieira et al. (2016) e também em um estudo cross-seccional conduzido por Mendes et al. (2010), em uma região de bioma amazônico, no Maranhão, que teve como objetivo identificar exposições e atividades associadas a positividade para *Hantavírus*. Acredita-se que, independente do relato de exposição ou não a roedores, as pessoas podem se contaminar de forma imperceptível. Alguns inquéritos sorológicos não encontraram uma diferença significativa na prevalência frente a proximidade aos vetores (LIMONGI et al., 2009; SANTOS et al., 2013). Alguns autores que encontraram esses mesmos dados levantaram uma suspeita semelhante de que tanto o grupo que declara exposição quanto o que declara não-exposição pode estar ocorrendo infecção de maneira despercebida (TORRES-MORALES, 2000; CAMPOS et al., 2003). Em um estudo desenvolvido por Romano (1996), cuja prevalência foi baixa em indivíduos com relato de contato a roedores, concluiu que essa proporção pode ocorrer devido a pequena população de roedores infectados.

Quando se comparou apenas os indivíduos positivos dos municípios de Manaus e Coari, fatores como caça a animais, alimentar-se de carne de roedor, ser mordido por roedor e observar a presença de roedores na residência ou no trabalho aumentaram significativamente a chance de detecção de anticorpos IgG anti-*Hantavírus* no município de Coari. Isso pode estar ligado a maior interação da população com roedores em virtude de costumes e/ou consequências das atividades laborais peculiares dos municípios do interior do Amazonas. Juntamente com essas atividades que ampliam o contato com roedores, condições limitadas de saneamento básico também influenciaram na maior prevalência em Coari, como falta de encanamento e tratamento de água e ausência de rede de esgoto.

Essas circunstâncias precárias de sanitização e higiene podem ser extrapoladas para o município de Manaus, uma vez que a prevalência de 6,6% pode ser considerada alta para um

local mais urbanizado. Tentando justificar essa positividade relativa, levantou-se a hipótese da circulação de espécies de *Hantavírus* em roedores na zona urbana, e isso pode estar associado a situações de higienização do ambiente. Essa suposição é corroborada por vários estudos citadinos. Em duas revisões sistemáticas com síntese narrativa, uma sobre a ecologia de zoonoses associada a ratos em centros urbanos (HIMSWORTH et al., 2013) e outra sobre infecções zoonóticas e transmitidas por vetores entre os moradores de rua e regiões urbanas pobres nos EUA e na Europa entre 1990 e 2014 (LEIBLER et al., 2016), foi evidenciado o *Hantavírus Seoul* como um dos patógenos encontrados em humanos e roedores das áreas mencionadas. Outros dois estudos foram realizados em Nova Iorque, EUA, para detectar agentes em hospedeiros e vetores. White et al. (1996) encontrou prevalências de 12% (97/809) para infecção por vírus *Sin Nombre* e 9,6% (78/809) para vírus *Seoul-like*, em amostras de ratos da pata branca coletadas em todo o estado em 1984. Além disso encontrou o vírus *Sin nombre*, por ELISA IgG, em 2 de 12 roedores capturados perto da residência de um paciente humano com SCPH em 1994. Firth et al. (2014) detectou que ratazanas comensais (*Rattus norvegicus*) transportam, dentre inúmeras bactérias e agentes infecciosos, o *Hantavírus Seoul*.

Muñoz-Zanzi et al. (2015) exibiu maiores evidências em casebres pobres e sujos (cerca de 1,5%) em relação a achados em fazendas (0,5%), bem como Castillo et al. (2012) que relatou o contraste da prevalência em população urbana (2,2%) e rural (1,1%) na Amazônia Peruana. Em um estudo no Brasil conduzido por Costa et al. (2014) em bairros urbanos de alta miséria na cidade de Salvador (BA), encontraram-se prevalências de 18% em amostras de ratazanas (*Rattus norvegicus*) capturadas tanto em 1998 quanto durante a estação chuvosa em 2010. Esses trabalhos indicam que ratos urbanos são reservatórios para uma vasta diversidade de micróbios que podem afetar a saúde humana, como LeDUC et al. (1985; 1986) já haviam mencionado precocemente, e que há uma necessidade de percepção de riscos de doenças associadas à infestação de roedores urbanos e condições ambientais de saneamento básico.

A análise da população total do estudo revelou que os municípios de Coari e Itacoatiara se mostraram como maior risco para infecção por *Hantavírus*, além do sexo feminino, atividades ocupacionais florestais e/ou agropecuária e o fato de ter ou ainda estar trabalhando com agricultura. Para tanto, quando se comparou as populações positivas de Manaus e Coari, os fatores que exibiram forte associação para maior prevalência em Coari, foram sexo feminino, ter ou ainda estar trabalhando com agricultura, observar sinais da presença de roedores nas residências ou locais de trabalho, renda familiar baixa e não possuir esgoto. As características populacionais e econômicas da região refletem a realidade de praticamente toda a população que reside nesse município. Coari é uma cidade com vegetação constituída de árvores e arbustos de terra firme, várzea de igapó e vegetação aquática, exibindo a agricultura, pesca, extrativismo e o gás do poço da região do Urucu como principais atividades econômicas, além de popularmente conhecida pela produção de banana, gás natural e petróleo (IBGE, 2013).

Assim como nos municípios do interior do Amazonas, Coari e Itacoatiara, cujas atividades laborais mais dominantes e, muitas vezes, responsáveis pela economia da região, estão voltadas à agricultura e pecuária, outros inquéritos realizados no Brasil também associam prevalências para *Hantavírus* com localidades de mesma característica ocupacional.

Dentre esses, temos valores de prevalência de: 14,3% em Jardinópolis (RP-SP) com economia local baseada na cana-de-açúcar, milho, soja, amendoim e culturas das frutas manga e abacate (CAMPOS et al., 2003); 4,7% em Cássia dos Coqueiros (MG) com 65% da economia voltada para agropecuária e com intensa semeadura de sementes de *Brachiaria decumbens* (BADRA et al., 2012); 3,5% nos municípios de Belmonte e Paraíso (SC), regiões de fronteiras com a Argentina, com economia voltada para monoculturas de milho, trigo e tabaco (SOUZA et al., 2011); 2,3% em Turvo (SC), local da mecanização agrícola e cultivo do arroz, milho e fumo (PEREIRA et al., 2012); e 0,6% em doadores de sangue de Ilhéus (BA) com principal componente econômico a produção de cacau (MORELI et al., 2012).

Na região Amazônica, as prevalências apontadas foram: 10,9% em Anajatuba (MA), região de planície com plantio de arroz (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2010); 4,7% em 6 dos 21 municípios das planícies ocidentais no Maranhão com vasta atividade agrícola (MENDES et al., 2010); 2,2% e 4,6% em Trairão e Novo Progresso, respectivamente, no estado do Pará, e 4,8% e 9,4% em Guarantã do Norte e Marcelândia, respectivamente, no estado do Mato Grosso, com intensa agricultura e extração de madeira (MEDEIROS et al., 2010); e 13% no assentamento Tupã (Marcelândia – MT), tendo a agricultura como meio de subsistência (SANTOS et al., 2013). Outro estudo encontrou prevalências de 1,6% no Rio Machado e 3% no município de Machadinho do Oeste, ambos no estado de Rondônia, onde a agricultura também é atividade de sustento, além de 7% em Teodoro Sampaio e 9% em Jacupiranga, ambos no estado de São Paulo, onde as principais ocupações são em fazendas de banana ou laranja e criação de gado e/ou peixes (MORAIS et al., 2016). Os recursos naturais dos solos amazônicos estimulam o extrativismo e o desmatamento, especialmente no Pará e Mato Grosso, onde há intensa exploração ambiental predatória e expansão territorial desordenada. De acordo com o Ministério da Saúde, a ocupação do ramo agropecuário, que envolve plantio/aragem de terra, colheita, moagem de grãos e arrumação de fardos, predomina significativamente nas investigações epidemiológicas para *Hantavírus* no Brasil (SANTOS & GARRET, 2005).

Quanto à existência de celeiros ou galpões para armazenamento de grãos e alimentos da colheita, foi demonstrado que houve uma associação significativa com positividade para *Hantavírus*. O oposto foi documentado por Mendes et al. (2010) e por Santos et al., (2013), entretanto foi consistente com um relato sobre a dinâmica do uso do solo e a distribuição da hantavirose na Amazônia Legal (SANTOS et al., 2012) e com um trabalho no Chile que descreveu maior risco associado às atividades de rotina que envolvem o uso e a limpeza das áreas de depósitos de sementes e alimentos, cujos locais aproximam o ambiente peri-doméstico aos roedores *Sigmodontinae* que vão em busca de comida (MUÑOZ-ZANZI et al., 2015).

Em suma, esse trabalho produziu uma proteína que pode ter aumentado a sensibilidade na detecção de anticorpos anti-*Hantavírus* na Região Amazônica. O inquérito sorológico foi realizado na capital do estado do Amazonas, Manaus, e dois municípios adjacentes, Coari e Itacoatiara. O estudo mostrou que infecções por *Hantavírus* estão associadas com o aumento da idade, com baixo nível socioeconômico e com o sexo feminino, embora o gênero possa estar fortemente relacionado a ocupações e comportamentos de risco. Foi possível determinar com clareza que atividades, passadas ou recentes, voltadas a áreas rurais ou àquelas que submetem a um estreito contato com roedores ou seus dejetos demonstraram aumentar o risco de infecção por *Hantavírus*. A intensa comunicação e migração que existe entre os ambientes urbano e rural, seja por motivos laborais ou recreativos, dificultou a determinação dos possíveis locais de infecção por *Hantavírus* nos moradores dos municípios estudados. O fato de a coleta ter sido de forma conveniente, embora tenha facilitado o trabalho de campo e consiga estimar a soroprevalência e os possíveis fatores de risco, prejudica a extensão dos achados epidemiológicos para a totalidade das populações envolvidas. Além disso, houve uma imprecisão na coleta de todos os dados. Para tanto, com todas as informações descritas acima, foram elaboradas algumas hipóteses e questões que podem ser investigadas futuramente:

Em termos proporcionais, em quanto um levantamento sorológico desenvolvido em uma mesma região e/ou mesma população pode se mostrar diferente utilizando distintas proteínas do nucleocapsídeo de *Hantavírus*?

A proteína aqui obtida poderia ser útil e confiável para produção de uma vacina?

Quantas e quais espécies de *Hantavírus* realmente estão circulantes no Amazonas e na Região Amazônica? As espécies circulantes seriam causadoras de doenças clínicas brandas e de menor gravidade? A que se deve a gravidade dessas infecções?

Haveria roedores silvestres adaptados à ambientes urbanos no Amazonas transmitindo *Hantavírus* nesse meio, uma vez que em outros biomas amazônicos já se tem esses achados?

## 7 CONCLUSÕES

A proteína N recombinante gerada pelos *Hantavírus* mais representativos da Região Amazônica se mostrou adequada para emprego em testes de imunoenaios na detecção de anticorpos.

As metodologias utilizadas de ELISA e Dot Blot, desenvolvidas com o antígeno produzido, mostraram-se confiáveis e sensíveis.

As infecções por *Hantavírus* apresentaram-se prevalentes em diferentes populações do estado do Amazonas.

As características populacionais encontradas nesse trabalho com maior prevalência foram no sexo feminino, nas classes etárias adultas e no baixo nível socioeconômico.

Os principais fatores de risco associados a detecção de anticorpos anti-*Hantavírus* estão voltados às atividades rurais, como economias agropecuárias, histórico de trabalho com agricultura, manutenção e armazenamento de alimentos e grãos.

As atividades ocupacionais, econômicas e condições de saneamento básico dos municípios do interior do Amazonas aumentam a probabilidade de infecção por *Hantavírus* em virtude da maior interação entre humanos e áreas florestadas, conseqüentemente maior proximidade aos vetores roedores e seus respectivos dejetos.

## 8 PERSPECTIVAS

É necessária uma melhor validação dos imunoenaios para determinação de especificidade e sensibilidade. Junto a isso, analisar a reação cruzada dos testes com amostras de outros vírus ou patógenos circulantes na Amazônia.

Pretende-se padronizar um teste comercial com a proteína produzida para utilização em métodos diagnósticos com parâmetros aceitáveis, precisos e seguros na detecção de anticorpos anti-*Hantavírus* na Região Amazônica.

Baseado nesse levantamento de dados e exibição da distribuição de *Hantavírus* em regiões do estado do Amazonas, auxiliar os serviços de saúde com medidas de vigilância, prevenção e controle.



## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMADA, T., YOSHIMATSU, K., KOMA, T., SHIMIZU, K., GAMAGE, C. D., SHIOKAWA, K., ARIKAWA, J. Development of an immunochromatography strip test based on truncated nucleocapsid antigens of three representative hantaviruses. **Virology Journal**, vol. 11, 87. 2014.
- AVSIC, T. Z., XIAO, S. Y., STOJANOVIC, R., GLIGIC, A., VAN DER GROEN, G., LEDUC, J. W. Characterization of Dobrava virus: a Hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. **Journal of Medical Virology** 38, 132–137. 1992.
- BADRA, SORAYA JABUR et al. A retrospective serologic survey of hantavirus infections in the county of Cássia dos Coqueiros, State of São Paulo, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 4, p. 468-470, Uberaba, Aug. 2012.
- BI, Z.; FORMENTY P.B.H.; ROTH, C.E.. Hantavirus Infection: a review and global update. **J Infect Dev Ctries** 2: 3–23, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8 ed. rev. – (Série B. Textos básicos em saúde) – Brasília : Ministério da Saúde, 2010a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. **Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde**. Rev Saúde Pública 44 (1) : 200-2. (Informe Técnico Institucional) – Brasília : Ministério da Saúde, 2010b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância, prevenção e controle das hantavíroses** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Casos e óbitos de hantavírose no Brasil de 1993 a 2015 [internet]**. Atualizado em 01/06/2015, citado 20/08/2015]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1558](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1558). Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde.
- BRUMMER-KORVENKONTIO M, VAHERI A, HOVI T, VON BONSDORFF CH, VUORIMIESJ, MANNI T, PENTTINEN K, OKER-BLOM N, LÄHDEVIRTA J: Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. **J Infect Dis**, 141:131-134. 1980.
- CAMPOS, G. M., DE SOUSA, R. L. M., BADRA, S. J., PANE, C., GOMES, U. A. AND FIGUEIREDO, L. T. M. Serological survey of hantavirus in Jardinópolis county, Brazil. **J. Med. Virol.**, 71: 417–422. Nov, 2003.

- CAMPOS, G.M.; BORGES, A.A.; BADRA, S.J.; FIGUEIREDO, G.G.; SOUZA, R.L.; MORELI, M.L.; FIGUEIREDO, L.T. Pulmonary and cardiovascular syndrome due to hantavirus: clinical aspects of an emerging disease in southeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 42 (3), 282–289. 2009.
- CASTILLO ORE, R.M.; FORSHEY, B.M.; HUAMAN, A.; VILLARAN, M.V.; LONG, K.C.; KOCHER, T.J.; GUEVARA, C.; MONTGOMERY, J.M.; ALVAREZ, C.A.; VILCARROMERO, S.; et al. Serologic Evidence for Human Hantavirus Infection in Peru. **Vector Borne Zoonotic Dis.** Vol. 12, p. 683–689. 2012.
- CDC. Recommendations and Reports. Addressing Emerging Infectious Disease Threats: A Prevention Strategy for the United States. **MMWR**; 43 / No. RR-5, 1994.
- CHILDS, J.E.; KSIAZEK, T.G.; SPIROPOULOU, C.F.; KREBS, J.W.; MORZUNOV, S.; MAUPIN, G.O.; et al. Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as the primary rodent reservoir for a new hantavirus in the southwestern United States. **J Infect Dis**; 169: 1271-1280, 1994.
- CHU, Y.K.; GOODIN, D.; OWEN, R.D.; KOCH, D.; JONSSON, C.B. Sympatry of 2 hantavirus strains, Paraguay, 2003–2007. **Emerg. Infect. Dis.** 15:1977– 1980. 2009.
- CLEMENT, J. et al. A unifying hypothesis and a single name for a complex globally emerging infection: Hantavirus disease. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 1–5, 2012.
- CLEMENT, J.; MAES, P.; RANST, M. V. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in the New, and Hantavirus Pulmonary Syndrome in the old world: Paradi(se)gm lost or regained? **Virus Research**, v187, p. 55–58, 2014.
- COLLIER, L. & OXFORD, J. **Human Virology**. Oxford University Press. Second Edition. USA, 2000.
- CORDOVA, Caio Maurício Mendes de & FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. Serologic Survey On Hantavirus In Blood Donors From The State Of Santa Catarina, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo , v. 56, n. 4, p. 277-279, Aug. 2014.
- COSTA, F.; et al. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul Virus, and Bartonella spp. Among Norway Rats (*Rattus norvegicus*) from the Urban Slum Environment in Brazil. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, vol. 14, n. 1, p. 33-40, 2014
- DONALÍSIO, M.R. et al. Aspectos climáticos em áreas de transmissão de hantavirose no estado de São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. p. 1141-1150, 2008.
- ELGH, F. et al. Development of humoral cross-reactivity to the nucleocapsid protein of heterologous hantaviruses in nephropathia epidemica. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, vol. 22, n. 4, p.309-315. 1998.
- ELKHOURY, M. R. et al. Boletim Eletrônico Epidemiológico MS/SVS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. [s.l: s.n.]. Ano 2005.

- ENGELTHALER, D. M. et al. Climatic and environmental patterns associated with hantavirus pulmonary syndrome, Four Corners region, United States. *Emerging infectious diseases*, v. 5, n. 1, p. 87–94, 1999.
- ENRÍA DA, PADULA P, SEGURA EL et al. Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina – possibility of person-to-person transmission. *Mediana* 56: 709-11. 1996.
- FERREIRA, M.; NISHIOKA, S.A.; SANTOS, T.L.; SANTOS, R.P.; SANTOS, P.S.; ROCHA, A. Hantavírus pulmonary syndrome in Brazil: Clinical aspects of three new cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42:41-46, 2000.
- FERRER, J. F.; REY, V.; GONZALEZ, L.; MURUA, A.; GUTIERREZ, S.; THAKURI, M.; FELDMAN, L.; ESTEBAN, E.; POIESZ, B.; GALLIGAN, D.; JONSSON, C. Hantavirus infection in people inhabiting a highly endemic region of the Gran Chaco territory, Paraguay: association with *Trypanosoma cruzi* infection, epidemiological features and haematological characteristics. *Ann Trop Med Parasitol*. Vol. 97, n. 3, p. 269-80. Apr, 2003.
- FIGUEIREDO, L.T.M., MORELI, M.L., CAMPOS, G.M., SOUSA, R.L. Hantaviruses in Sao Paulo State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 891–892. 2003.
- FIGUEIREDO, L.T.M.; MORELI, M.L.; BORGES, A.A.; FIGUEIREDO, G.G.; SOUZA, R.L.M.; AQUINO, V.H. Expression of a hantavirus N protein and its efficacy as antigen in immune assays. *Braz J Med Biol Res*; 41:596-599, 2008.
- FIGUEIREDO, L.T.M.; et al. Viral Diversity Genetic Network Consortium. Hantavirus pulmonary syndrome, central plateau, southeastern, and southern Brazil. *Emerg Infect Dis.* Apr; vol. 15, n. 4, p. 561-7. 2009.
- FIGUEIREDO, L.T.M.; MORELI, M. L.; BORGES, A. A.; DE FIGUEREDO, G. G.; BADRA, S. J.; BISORDI, I.; SUZUKI, A.; CAPRIA, S.; PADULA, P. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on *Araraquara* virus recombinant nucleocapsid protein. *The American Journal of tropical medicine and hygiene*, vol.81, p. 273-276. 2009.
- FIGUEIREDO, L.T.M., et al., Hantaviruses and cardiopulmonary syndrome in South America. *Virus Res.* 2014.
- FIGUEIREDO, G. G. DE et al. Diagnosis of hantavirus infection in humans and rodents in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 43, n. 4, p. 348-354, Aug. 2010.
- FIRTH, C. et al. Diversity and distribution of hantaviruses in South America. *Journal of virology*, v. 86, n. 24, p. 13756–66, dez. 2012.
- FIRTH C, BHAT M, FIRTH MA, WILLIAMS SH, FRYE MJ, SIMMONDS P, CONTE JM, NG J, GARCIA J, BHUVA NP, LEE B, CHE X, QUAN P-L, LIPKIN WI. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *mBio*, vol. 5, n. 5, e01933-14, p.1-16. Oct 2014.

- FRANKO, M.C., GIBBS JR., C.J., LEE, P.W., GAJDUSEK, D.C. Monoclonal antibodies specific for Hantaan virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 80, 4149–4153. 1983.
- GALENO H, MORA J, VILLAGRA E, FERNANDEZ J, HERNANDEZ J, MERTIZ GJ, et al. First human isolate of hantavirus (Andes virus) in the Americas. **Emerg Infect Dis**. vol. 8, p. 657–61. 2002.
- GARCIN, D., LEZZI, M., DOBBS, M., ELLIOTT, R. M., SCHMALJOHN, C., KANG, C. Y. & KOLAKOFSKY, D. The 5' ends of Hantaan virus (Bunyaviridae) RNAs suggest a prime-and-realign mechanism for the initiation of RNA synthesis. **J Virol** 69, 5754–5762. 1995.
- GAVRILOVSKAYA, I.N., SHEPLEY, M., SHAW, R., GINSBERG, M.H., MACKOW, E.R. Beta3- Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 95, 7074–7079. 1998.
- GAVRILOVSKAYA, I.N.; BROWN, E.J.; GINSBERG, M.H.; MACKOW, E.R. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. **J Virol**. May;73(5):3951-9, 1999.
- GIMAQUE, J. B. L.; BASTOS, M. D. S.; BRAGA, W. S. M.; OLIVEIRA, C. M. C. DE; CASTILHO, M. D. C., FIGUEIREDO, R. M. P. DE; GALUSSO, E. D. S.; ITAPIREMA, E. F.; FIGUEIREDO, L. T. M. DE, MOURÃO, M. P. G. Serological evidence of Hantavirus infection in rural and urban regions in the state of Amazonas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 107, 135-137, 2012.
- GLIGIC, A., DIMKOVIC, N., XIAO, S.Y., BUCKLE, G.J., JOVANOVIC, D., VELIMIROVIC, D., STO-JANOVIC, R., OBRADOVIC, M., DIGLISIC, G., MICIC, J., ET AL. Belgrade virus: a new hantavirus causing severe hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia. **Journal of Infectious Diseases** 166, 113–120. 1992.
- GUO, W.P.; LIN, X.D.; WANG, W.; TIAN, J.H.; CONG, M.L.; ZHANG, H.L.; WANG, M.R.; ZHOU, R.H.; WANG, J.B.; LI, M.H.; et al. Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. **PLoS Pathog**. 2013.
- HEIDER et al. A chemiluminescence detection method of hantaviral antigens in neutralisation assays and inhibitor studies. **Journal of virological methods** 96, 17-23. 2001.
- HJELLE B, TORREZ-MARTINEZ N, KOSTER FT. Hantavirus pulmonary syndrome-related virus from Bolivia. **Lancet**; 347: 57. 1996.
- HJELLE, B., & TORRES-PÉREZ, F. Hantaviruses in the Americas and Their Role as Emerging Pathogens. **Viruses** 2(12), 2559–2586. 2010.
- HJELLE, B., LEE, S. W., SONG, W., TORREZ-MARTINEZ, N., SONG, J. W., YANAGIHARA, R., GAVRILOVSKAYA, I., AND MACKOW, E. R. Molecular linkage of hantavirus pulmonary syndrome to the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*: genetic characterization of the M genome of New York virus. **J. Virol.** 69, 8137–8141.1995.

- HIMSWORTH, C.G., PARSONS, K.L., JARDINE, C., PATRICK, D.M. Rats, cities, people, and pathogens: a systematic review and narrative synthesis of literature regarding the ecology of rat-associated zoonoses in urban centers. **Vector Borne Zoonotic Dis.** Vol. 13, n. 6, p. 349-59. Jun 2013.
- HOLMES, R., BOCCANERA, R., FIGUEIREDO, L. T., MANÇANO, S. R., & PANE, C.. Seroprevalence of human hantavirus infection in the Ribeirão Preto region of São Paulo State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 6, n. 5, p. 560–561. 2000.
- HUGHES, J.M.; PETERS, C.J.; COHEN, M.L.; MAHY, B.W. Hantavirus pulmonary syndrome: an emerging infectious disease. **Science** 262 (5135), 850–851, 1993.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Município de Coari do Estado de Amazonas. Infográficos: histórico. Censo de 2000. 2013.
- IVERSSON, L. B., BRANQUINHO, M. S., AND ROSA, M. D. Serologic survey on hantavirus human infection in Jucituba state of Sao Paulo, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 53(Suppl.). [Abstract 439], 1995.
- JIN, M., J. PARK, S. LEE, B. PARK, J. SHIN, K. J. SONG, T. I. AHN, S. Y. HWANG, B. Y. AHN, AND K. AHN. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. **Virology** 294:60–69. 2002.
- JONHSON, A. M., BOWEN, M. D., KSIAZEK, T. G., WILLIAMS, R. J., BRYAN, R. T., MILLS, J. N., PETERS, C. J., NICHOL, S. T. Laguna Negra Virus Associated with HPS in Western Paraguay and Bolivia, **Virology**, vol. 238, n. 1, p. 115-127. 1997.
- JOHNSON A. M., SOUZA L. T., FERREIRA I. B., PEREIRA L. E., KSIAZEK T. G.; ROLLIN P. E., PETERS C. J., NICHOL S. T. Genetic investigation of a novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. **Journal Medical Virology**; 59(4): 527-535. 1999.
- JONSSON, C. B. & SCHMALJOHN, C. S. Replication of hantaviruses. **Curr Top Microbiol Immunol** 256, 15–32. 2001.
- JONSSON, C. B.; GALLEGOS, J.; FERRO, P.; SEVERSON, W.; XU, X.; SCHMALJOHN, C. S. Purification and Characterization of the Sin Nombre Virus Nucleocapsid Protein Expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification** v. 23, n. 1, p. 134–141, 2001.
- JONSSON, C.B.; FIGUEIREDO, L.T.; VAPALAHTI, O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. **Clin. Microbiol. Rev.** 23 (2), 412–441, 2010.
- KANERVA, M., MUSTONEN, J. & VAHERI, A. Pathogenesis of Puumala and other hantavirus infections. **Rev. Med. Virol.** 8:67–86. 1998.
- KLEMPA, B. Hantaviruses and climate change. **Clinical microbiology and infection** 15, 518-523, 2009.

- KRUGER, D. H.; FIGUEIREDO, L.T.M.; SONG, J.W.; KLEMPA, B. Hantaviruses—Globally emerging pathogens. **Journal of Clinical Virology** 64, 128–136, 2015.
- KSIAZEK, T.G.; PETERS, C.J.; ROLLIN, P.E.; 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.**52:117–23. 1995.
- LEDERER, S.; LATTWEIN, E.; HANKE, M.; SONNENBERG, K.; STOECKER, W.; et al. Indirect Immunofluorescence Assay for the Simultaneous Detection of Antibodies against Clinically Important Old and New World Hantaviruses. **PLoS Negl Trop Dis** 7(4): e2157, 2013.
- LeDUC, J.W.; SMITH, G.A.; CHILDS, J.E. et al. – Global survey of antibody to Hantaan-related viruses among peridomestic rodents. **Bull. Wld. Hlth. Org.**, 64:139-144, 1986.
- LeDUC, J.W.; SMITH, G.A.; PINHEIRO, F.P. et al. – Isolation of a hantaan-related virus from Brazilian rats and serologic evidence of its widespread distribution in South America. **Amer. J. trop. Med. Hyg.**, 34:810-815, 1985.
- LEE, H.W.; VAHERIB, A.; SCHMALJOHNC, C.S. Discovery of hantaviruses and of the Hantavirus genus: Personal and historical perspectives of the Presidents of the International Society of Hantaviruses. **Virus Research** 187 2–5, 2014.
- LEE et al. RNA helicase retinoic acid-inducible gene I as a sensor of Hantaan virus replication. **The Journal of general virology**, 2191-2200. 2011.
- LEE, H. W. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. **Reviews of infectious diseases** 11(4): 864-876, 1989.
- LEE, H.W.; BAEK, L.J.; JOHNSON, K.M. Isolation of *Hantaan* virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. **J Infect Dis** 146: 638-644. 1982.
- LEE, H.W.; LEE, P.W.; LÄHDEVIRTA, J.; BRUMMER-KORVENTKONTIO, M. Aetiological relation between Korean haemorrhagic fever and nephropathia epidemica. **Lancet**. Jan 27;1(8109):186-7, 1979.
- LEE, H.W.; LEE, P.W.; JOHNSON, K.M. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. **J Infect Dis**. 137:298–308, 1978.
- LEIBLER, J.H., ZAKHOUR, C.M., GADHOKE, P., GAETA, J.M. Zoonotic and Vector-Borne Infections Among Urban Homeless and Marginalized People in the United States and Europe, 1990-2014. **Vector Borne Zoonotic Dis**. Vol. 16, n. 7, p. 435-44. Jul 2016.
- LEVIS, S.; MORZUNOV, S.; ROWE, J.E. et al. Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. **J. Infect. Dis**. 177:529–538. 1998.
- LIMA, DANIELLE MALTA et al. Hantavirus infection in suspected dengue cases from State of Ceará, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 44, n. 6, p. 795-796, Dec. 2011.

- LIMONGI, J. E., DA COSTA, F. C., PINTO, R. M. C., DE OLIVEIRA, R. C., BRAGAGNOLO, C., LEMOS, E. R. S. FERREIRA, M. S. Cross-sectional Survey of Hantavirus Infection, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 15, n. 12, p.1981–1983. 2009.
- LOPES, L. B. de et al. Rickettsia bellii, Rickettsia amblyommii, and Laguna Negra hantavirus in an Indian reserve in the Brazilian Amazon. **Parasites & vectors**, v. 7, p. 191, jan. 2014.
- LÓPEZ, N., PADULA, P., et al Genetic identification of a new hantavirus causing severe pulmonary syndrome in Argentina. **Virology** 220: 223-6. 1996.
- LUNA, E.J.A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol.** Vol. 5, Nº 3, p. 229-43, 2002.
- LUNDKVIST, A.; WIGER, D.; HÖRLING, J.; SJÖLANDER, K.B.; PLYUSNINA, A.; MEHL, R.; VAHERI, A.; PLYUSNIN, A. Isolation and characterization of Puumala hantavirus from Norway: evidence for a distinct phylogenetic sublineage. **J Gen Virol.** Nov;79 (Pt11):2603-14, 1998.
- MACHADO, A.M. Construção de baculovírus recombinates contendo o gene da nucleoproteína do hantavirus Araraquara. [dissertação]. São Paulo (Brasil): Universidade de Mogi das Cruzes, 2007.
- MAES, P., et al. A proposal for new criteria for the classification of hantaviruses, based on S and M segment protein sequences. **Infect. Genet. Evol.** 9:813–820. 2009.
- MANIGOLD, T. & VIAL, P. Human hantavirus infections: epidemiology, clinical features, pathogenesis and immunology. Swiss Medical Weekly. **The European Journal of Medical Sciences** 144:w13937, 2014.
- MARTINEZ-VALDEBENITO C, CALVO M, VIAL C, MANSILLA R, MARCO C, PALMA RE, et al. Person-to-person household and nosocomial transmission of Andes hantavirus, southern Chile, 2011. **Emerging Infectious Diseases** Vol. 20, No. 10, October 2014.
- MATTAR, S., GUZMÁN, C., FIGUEIREDO, L.T.M. Diagnosis of hantavirus infection in humans. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.** Early online, p. 1–8. 2015.
- MEDEIROS, D. BA et al. Circulation of hantaviruses in the influence area of the Cuiabá-Santarém Highway. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 5, p. 665-671, Aug. 2010.
- MENDES, W.S.; SILVA, A.A.M.; ARAGÃO, L.F.C.; ARAGÃO, N.J.L.; RAPOSO, M.L.; ELKHOURY, M.R.; SUZUKI, A.; FERREIRA, I.B.; SOUSA, L.T.; PANUTTI, C. Hantavirus infection in Anajatuba, Maranhão, Brazil. **Rev Inst Med Trop**; 43:237-240, 2001.
- MENDES, W. S., DA SILVA, A. A. M., NEIVA, R. F., COSTA, N. M., DE ASSIS, M. S., VIDIGAL, P. M. O., DA C. VASCONCELOS, P. F. Serologic Survey of Hantavirus Infection, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 16, n. 5, 889–891. 2010.

- MIGUEL, M. P., DE MENEZES, L. B., DE ARAÚJO, E. G. Western Blotting: A Técnica e Aplicações na Pesquisa e Rotina Diagnóstica em Medicina Veterinária. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p.1707-1719. Nov, 2012.
- MIR, M. A. & PANGANIBAN, A. T. The triplet repeats of the Sin Nombre hantavirus 5' untranslated region are sufficient in cis for nucleocapsid-mediated translation initiation. **J Virol**, vol. 84, p. 8937–8944. 2010.
- MONTOYA-RUIZ, C.; DIAZ, F. J.; RODAS, J. D. Recent evidence of hantavirus circulation in the American Tropic. **Viruses**, v. 6, n. 3, p. 1274–93, jan. 2014.
- MORAIS, F. A., PEREIRA, A., PEREIRA, A. S. P., et al. Serological Survey of Hantavirus in Inhabitants from Tropical and Subtropical Areas of Brazil. **Advances in Virology**, vol. 2016, p. 1-6, 2016.
- MORELI, M. L. E. Diagnóstico de Hantavírus por Detecção Genômica com Estudo Filogenético e Produção de uma Proteína N Recombinante. **Tese de Doutorado da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto**. 2005.
- MORELI, M. L.; DA COSTA, V. G.; PARIZ, F. R. A Seroepidemiological Survey of Hantavirus in Ilheus County. **American Journal of Virology**, vol. 1, n. 1, p.18-23, 2012.
- MORSE, S.S. Factors in the Emergence of Infectious Diseases. **Emerg Infect Dis**; 1(1): 7-15, 1995.
- MORZUNOV, S.; FELDMANN, H., SPIROPOULOU, C. F., SEMENOVA, V. A., ROLLIN, P. E., KSIAZEK, T. G., PETERS, C. J., AND NICHOL, S. T. A newly recognized virus associated with a fatal case of hantavirus pulmonary syndrome in Louisiana. **J. Virol.** 69, 1980–1983. 1995.
- MUÑOZ-ZANZI, C., SAAVEDRA, F., OTTH, C., DOMANCICH, L., HOTT, M., & PADULA, P. Serological Evidence of Hantavirus Infection in Apparently Healthy People from Rural and Slum Communities in Southern Chile. **Viruses**, vol. 7, n. 4, p. 2006–2013. 2015.
- MUSTONEN. J.; VAPALAHTI, O.; HENTTONEN. H.; PASTERNAK, A.; VAHERI, A. Epidemiology of hantavirus infections in Europe. **Nephrol Dial Transplant**. Nov;13(11):2729-31, 1998.
- MYHRMAN, G. En njursjukdom med egenartad symptombild. **Nord. Med. Tidskr.** 7:793–794. 1934.
- NICHOL, S.T. Bunyaviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; eds. **Field's Virology**, Vol 2, 4th ed Philadelphia, Pa Lippincott Williams Wilkins. p. 1603–33. 2001.
- NICHOL, S.T.; SPIROPOULOU, C.F.; MORZUNOV, S.; ROLLIN, P.E.; KSIAZEK, T.G.; FELDMANNH, et al. Genetic identification of a novel hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness in the southwestern Unites States. **Scienc**; 262:914-917, 1993.

- NICHOL, S.T.; SPIROPOULOU, C.F.; MORZUNOV, S.; ROLLIN, P.E.; KSIAZEK, T.G.; FELDMANN, H.; SANCHEZ, A.; CHILDS, J.; ZAKI, S.; PETERS, C.J. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. **Science** 262, 914–917, 1993.
- NIKLASSON. B.; LeDUC, J.W. Epidemiology of nephropathia epidemica in Sweden. **J Infect Dis.** Feb;155(2):269-76, 1987.
- NOLTE, K.B. et al. Hantavirus Pulmonary Syndrome: A Pathological Description of a Disease Caused by a New Agent. **Human Pathology**, volume 26, No. 1. January, 1995.
- NSOESIE, E. O.; MEKARU, S. R.; RAMAKRISHNAN, N.; MARATHE, M. V.; BROWNSTEIN, J. S. Modeling to Predict Cases of Hantavirus Pulmonary Syndrome in Chile. **PLoS Neglected Tropical Disease** 8(4): e2779, 2014.
- NUNES, M. L. et al. Caracterização clínica e epidemiológica dos casos confirmados de hantaviose com local provável de infecção no bioma Cerrado Brasileiro, 1996 a 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 537–545, dez. 2011.
- OLIVEIRA, R. C. et al. Rio Mamoré Virus and Hantavirus Pulmonary. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. 1568–70, 2014.
- OLIVEIRA, S. V. et al. Potential geographic distribution of hantavirus reservoirs in Brazil. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e85137, jan. 2013.
- OPS. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Hantavírus em las Américas: guía para el diagnóstico, el tratamiento, la prevención y el control. Washington: **Organización Panamericana de La Salud**; 1999.
- PADULA P. J., EDELSTEIN A., MIGUEL S.D.L., LÓPEZ N. M., ROSSI C. M., RABINOVICH R. D. Hantavirus Pulmonary Syndrome Outbreak in Argentina: Molecular Evidence for Person-to-Person Transmission of Andes Virus. **Virology** 241, 323–330. 1998.
- PATTAMADILOK, S., B. H. LEE, S. KUMPERASART, K. YOSHIMATSU, M. OKUMURA, I. NAKAMURA, K. ARAKI, Y. KHOPRASERT, P. DANGSUPA, P. PANLAR, B. JANDRIG, D. H. KRUGER, B. KLEMPA, T. JAKEL, J. SCHMIDT, R. ULRICH, H. KARIWA, AND J. ARIKAWA. Geographical distribution of hantaviruses in Thailand and potential human health significance of Thailand virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 75:994–1002. 2006.
- PEREIRA, G. W. et al. Prevalence of serum antibodies to hantavirus in a rural population from the southern state of Santa Catarina, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 45, n. 1, p. 117-119, Feb. 2012.
- PINCELLI, M. P.; BARBAS, C. S. V.; CARVALHO, C. R. R. DE; SOUZA, L. T. M. DE; FIGUEIREDO L. T. M. Síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavírus. **Jornal de Pneumologia** 29, 309-323, 2003.

- PINTO JUNIOR, V. L. et al. Twenty years of hantavirus pulmonary syndrome in Brazil : a review of epidemiological and clinical aspects. **The Journal of Infection in Developing C**, v. 8, n. 2, p. 137–142, 2014.
- PLYUSNIN, A. et al. Bunyaviridae. A.M.Q. KING, E.J. LEFKOWITZ, M.J. ADAMS, E.B. CARSTENS (Eds.), *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, **Elsevier**, San Diego, 2012.
- PLYUSNIN, A. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. **Arch Virol**, vol. 147, n. 4, p. 665-82. Apr 2002.
- PLYUSNIN, A.; VAPALAHTI, O.; VAHERI, A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. **J Gen Virol.**; 77(Pt 11): 2677–2687. Nov, 1996.
- PRASAD, K. J. Emerging and re-emerging parasitic diseases. **JIMSA**: Vol. 23, no. 1, January – March, 2010.
- PRIMROSE, S. B., TWYMAN, R. M., OLD, R.W. Basic Techniques. In: **Principles of Gene Manipulation**, 6h edition, Blackwell Science, chapter 2, p. 17-18, 2001.
- RABONI, S. M. et al. Hantavirus infection in Brazil: development and evaluation of an enzyme immunoassay and immunoblotting based on N recombinant protein. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** **58**, 89–97, 2007.
- RABONI, S. M. et al. Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of Brazil: case report. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 45, n. 2, p. 153–6, jul. 2009.
- RAVKOV, E. V., ROLLIN, P. E., KSIAZEK, T. G., PETERS, C. J., AND NICHOL, S. T. Genetic and serologic analysis of Black Creek Canal virus and its association with human disease and *Sigmodon hispidus* infection. **Virology** 210, 482–489. 1995.
- RAYMOND, T., GORBUNOVA, E., GAVRILOVSKAYA, I.N., MACKOW, E.R. Pathogenic hantaviruses bind plexin–semaphorin–integrin domains present at the apex of inactive, bent alphavbeta3 integrin conformers. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 102, 1163–1168., 2005.
- ROMANO, N. S. Fatores de Risco e de predição para infecções por Arbovirus e Hantavirus em famílias de área de reserva ecológica no Vale do Ribeira, SP. **Tese de Mestrado da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo**. 1996.
- SANTOS, E. D. DOS & GARRETT, D. O. Avaliação do Sistema de Vigilância de Hantavírus no Brasil. [**Epidemiologia e Serviços de Saúde**, vol. 14, n. 1, p. 15 - 31]. SVS/MS. 2005.
- SANTOS, M. C. DOS et al. Human Hantavirus Infection , Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 7, p. 1165–1167, 2006.
- SANTOS, J. P. DOS et al. Dinâmica do uso da terra e a hantavirose na Amazônia Legal. v. 163, n. 15, p. 33–43, 2012.

- SANTOS, I. O. et al. Serologic survey of hantavirus in a rural population from the northern State of Mato Grosso, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 46, n. 1, p. 30-33, Feb. 2013.
- SCHMALJOHN C.S. & DALRYMPLE J.M. Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of Bunyviridae. **Virology** 131:482-491, 1983.
- SCHMALJOHN, C. & HJELLE, B. Hantaviruses: a global disease problem. **Emerg Infect Dis.** 3:95-104. 1997.
- SCHMALJOHN, C. S. & NICHOL, S. T. **Fields Virology**, Bunyaviridae 5a edição, 2o V. H. P. Knipe D.M. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), 2007.
- SCHMALJOHN, C. S. & NICHOL, S. T. **Hantaviruses**. 1st edition. (ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg), New York, 2001.
- SCHMIDT, J. et al. Development and evaluation of serological assays for detection of human hantavirus infections caused by *Sin Nombre* virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 33, n. 3, p. 247-253, 2005.
- SCHMIDT, J. et al. Serological Assays for the Detection of Human Andes Hantavirus Infections Based on Its Yeast-Expressed Nucleocapsid Protein. **Intervirology**, vol. 49, p.173-184. 2006.
- SIBOLD, C., ULRICH, R., LABUDA, M., LUNDKVIST, A., MARTENS, H., SCHUTT, M., GERKE, P., LEITMEYER, K., MEISEL, H. and KRUGER, D. H. Dobrava hantavirus causes hemorrhagic fever with renal syndrome in Central Europe and is carried by two different Apodemus mice species. **J. Med. Virol.** Vol. 63, p. 158-167. 2001.
- SILVA-VERGARA, M.L.; COSTA, J.C. JR.; BARATA, C.H.; CURI, V.G.; TIVERON, C.G. JR.; TEIXEIRA, A.C. Hantavirus pulmonary syndrome in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Sep;97(6):783-7. 2002.
- SILVA, M.V.; VASCONCELOS, M.J.; HIDALGO, N.T.R.; VEIGA, A.P.R.; CANZIAN, M.; MAROTTO, P.C.F.; et al. Hantavirus pulmonary syndrome: Report of the first three cases in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**; 39:231-234, 1997.
- SMADEL, J.E. Epidemic hemorrhagic fever. **Am J Public Health Nations Health.** Oct;43(10):1327-30. 1953.
- SOUZA, W. Doenças negligenciadas. Ciência e tecnologia para o desenvolvimento nacional. Estudos estratégicos. **Academia Brasileira de Ciências** – Rio de Janeiro: 2010.
- SOUZA, W. M. de et al. Serosurvey of hantavirus infection in humans in the border region between Brazil and Argentina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 44, n. 2, p. 131-135, Apr. 2011.
- STOTT, D.I. Immunoblotting and Dot Blotting. **Journal of Immunological Methods.** vol. 119, p. 153-187. 1989.

- SUPUTTHAMONGKOL, Y., et al. Hantavirus infection in Thailand: first clinical case report. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health** 36:700–703. 2005.
- SUZUKI A., BISORDI I., LEVIS S., GARCIA J., PEREIRA L. E., SOUZA R. P., SUGAHARA T. K. N., PINI N., ENRIA D., SOUZA LTM. Araraquara and Jquitiba hantavirus in southern and southeastern Brazil: genetic identification of their rodent reservoirs. **Emerging Infectious Diseases** 10(12):2127-2134. 2004.
- TEIXEIRA, K. DA G. et al. **Boletim Eletrônico Epidemiológico MS/SVS** - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. [s.l: s.n.]. Ano 2006.
- TORRES-MORALES, A. E. Soro-epidemiologia da Hantavirose em homens de Salvador-Bahia, Brasil. **Tese de Doutorado da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**. 2000.
- TRAVASSOS DA ROSA, E.S., 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.** 5:11–19. 2005.
- TRAVASSOS DA ROSA, E. S., SAMPAIO DE LEMOS, E. R., MEDEIROS, D. B. DE A., SIMITH, D. B., PEREIRA, A. DE S., ELKHOURY, M. R., VASCONCELOS, P. F. DA C. Hantaviruses and Hantavirus Pulmonary Syndrome, Maranhão, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 16, n. 12, p. 1952–1955. 2010.
- VAHERI, A.; STRANDIN, T.; HEPOJOKI, J.; SIRONEN, T.; HENTTONEN, H.; MÄKELÄ, S. et al. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. **Nat Rev Micro- boil.** Aug [cited 2013 Oct 13];11(8):539–50, 2013.
- VASCONCELOS, P. F. C. et al. Evidence of circulating hantaviruses in Brazilian Amazonia through high prevalence of antibodies in residents of Manaus, Brazil. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 44, n. 2/3, p. 162–3, 1992.
- VERITY, R., PRASAD, E., GRIMSRUD, K., ARTSOB, H., DREBOT, M., MIEDZINSKI, L. & PREIKSAITIS, J. Hantavirus pulmonary syndrome in northern Alberta, Canada: clinical and laboratory findings for 19 cases. **Clin. Infect. Dis.** 31:942–946. 2000.
- VIEIRA, CARLA JULIA DA SILVA PESSOA et al. Serological evidence of hantavirus infection in an urban area in Mato Grosso State, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 49, n. 3, p. 348-350, June 2016.
- 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**, vol. 277, p. 14–9. 2000.
- VOGEL, F. S. P; SILVA, M. S. Bunyaviridae In: FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Ed. da UFSM – Santa Maria, cap 29, p. 755-768. 2007.

- WELLS, R. M., SOSA STANI, S., YADO´ N, Z. E., ENRIA, E., PADULA, P., PINI, N., MILLS, J. N., PETERS, C. J., SEGURA, E. L., and the Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: Person-to-person transmission?. **Emer. Infect. Dis.** 3, 171–174. 1997.
- WHITE, D.J., et al. Human and rodent hantavirus infection in New York State: public health significance of an emerging infectious disease. **Arch Intern Med.** Vol. 156, n. 7, p. 722-6. 8 Apr 1996.
- WILLEMANN, M. C. A. & OLIVEIRA, S. V. de. Risk factors associated with hantaviriosis fatality: a regional analysis from a case-control study in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 47(1):47-51, Jan-Feb, 2014.
- WILLIAMS, R. J., BRYAN, R. T., MILLS, J. N., PALMA, R. E., VERA, I., DE VELASQUEZ, F., ... KSIAZEK, T. G. An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome in western Paraguay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 57, n. 3, p. 274-282. Sep 1997.
- WITKOWSKI, P.T., LEENDERTZ, S.A.J., AUSTE, B., AKOUA-KOFFI, C., SCHUBERT, G., KLEMPA, B., MUYEMBE-TAMFUM, J-J., KARHEMERE, S., LEENDERTZ, F.H., KRÜGER, D.H. Human seroprevalence indicating hantavirus infections in tropical rainforests of Côte d'Ivoire and Democratic Republic of Congo. **Front. Microbiol.** Vol. 6, n. 518. 2015.
- YANAGIHARA, R., GAJDUSEK, D.C., GIBBS JR., C.J., TRAUB, R. Prospect Hill virus: serologic evidence for infection in mammologists. **New England Journal of Medicine** 310, 1325–1326. 1984.
- YEE et al. Rapid and Simple Method For Screening Wild Rodents For Antibodies To Sin Nombre Hantavirus. **Journal of Wildlife Diseases**, vol. 39, no. 2, p. 271-277. April, 2003.
- YOSHIMATSU, K.; ARIKAWA, J. Serological diagnosis with recombinant N antigen for hantavirus infection. **Virus Research**, v. 187, p. 77–83, 2014.
- YOUNG, J.C.; HANSEN, G.R.; GRAVES, T.K.; DEASY, M.P.; HUMPHREYS, J.G.; FRITZ, C.L.; GORHAM, K.L.; KHAN, A.S.; KSIAZEK, T.G.; METZGER, K.B.; PETERS, C.J. The incubation period of hantavirus pulmonary syndrome. **Am J Trop Med Hyg.** Jun;62(6):714-7, 2000.
- ZEIER, M. et al. New ecological aspects of hantavirus infection: a change of a paradigm and a challenge of prevention--a review. **Virus genes**, v. 30, n. 2, p. 157–80, mar. 2005.
- ZETTERHOLM, S. G. Akuta nefriter simulerande akuta bukfall. **Sven. Lakartidn.** 31:425–429. 1934.
- ZHANG, Y.Z.; LIN, X.D.; SHI, N.F.; WANG, W.; LIAO, X.W.; GUO, W.P.; FAN, F.N.; HUANG, X.M.; LI, M.H.; LI, M.F.; CHEN, Y.; CHEN, X.F.; FU, Z.F.; PLYUSNIN, A. Hantaviruses in small mammals and humans in the coasta region of Zhejiang Province, China. **J med Virol** May;82(6):987-95. 2010.

## 11 APÊNDICES

## APÊNDICE A – Digestões enzimáticas com volume de 10 µL

<b>Digestão enzimática</b>			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pBSK-N (160 ng)	2 µL	37°C	2 horas
BSA 10X (1µg/µL)	1 µL		
NdeI (20U/µL)	0,5 µL		
NotI (10U/µL)	0,5 µL		
Tampão NEB3 10X	1 µL		
H <sub>2</sub> O	5 µL		
Volume total	10 µL		

Tabela 18. Descrição da reação enzimática e condições reacionais para a digestão da sequência codificadora da proteína N\_AM\_Hanta do vetor sintético pBSK-N.

<b>Digestão enzimática</b>			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pGSHP (150 ng)	5 µL	37°C	2 horas
BSA 10X (1µg/µL)	1 µL		
NdeI (20U/µL)	0,5 µL		
NotI (10U/µL)	0,5 µL		
Tampão NEB3 10X	1 µL		
H <sub>2</sub> O	2 µL		
Volume total	10 µL		

Tabela 19. Descrição da reação enzimática e condições reacionais para a digestão da sequência codificadora da HGPR1 do vetor de expressão pGS.

APÊNDICE B – Digestões enzimáticas com volume de 50  $\mu\text{L}$

<b>Digestão enzimática</b>			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pBSK-N (800 ng)	10 $\mu\text{L}$	37°C	2 horas
BSA 10X (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	5 $\mu\text{L}$		
NdeI (20U/ $\mu\text{L}$ )	2,5 $\mu\text{L}$		
NotI (10U/ $\mu\text{L}$ )	2,5 $\mu\text{L}$		
Tampão NEB3 10X	5 $\mu\text{L}$		
H <sub>2</sub> O	25 $\mu\text{L}$		
Volume total	50 $\mu\text{L}$		

Tabela 20. Descrição da reação enzimática e condições reacionais para a nova digestão e purificação da sequência codificadora da proteína N\_AM\_Hanta.

<b>Digestão enzimática</b>			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pGSHP (750 ng)	25 $\mu\text{L}$	37°C	2 horas
BSA 10X (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	5 $\mu\text{L}$		
NdeI (20U/ $\mu\text{L}$ )	2,5 $\mu\text{L}$		
NotI (10U/ $\mu\text{L}$ )	2,5 $\mu\text{L}$		
Tampão NEB3 10X	5 $\mu\text{L}$		
H <sub>2</sub> O	10 $\mu\text{L}$		
Volume total	50 $\mu\text{L}$		

Tabela 21. Descrição da reação enzimática e condições reacionais para a nova digestão e purificação do plasmídeo de expressão pGS linearizado.

APÊNDICE C – Inserção da sequência da proteína ao vetor e confirmação enzimática

<b>Inserção fragmento ao vetor</b>			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pGS linear (150 ng)	5 $\mu$ L	16°C	10 horas
Gene N (80 ng)	0,8 $\mu$ L		
T4 DNA Ligase (20U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L		
Tampão T4 10X	1 $\mu$ L		
H <sub>2</sub> O	2,2 $\mu$ L		
Volume total	10 $\mu$ L		

Tabela 22. Descrição da reação enzimática e condições reacionais para a inserção da sequência codificadora da proteína N\_AM\_Hanta no vetor de expressão pGS.

<b>Digestão enzimática</b>			
Reagentes	Volume	Temperatura	Tempo
Vetor pGSNH (120 ng)	6 $\mu$ L	37°C	2 horas
BSA 10X (1 $\mu$ g/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L		
NdeI (20U/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L		
NotI (10U/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L		
Tampão NEB3 10X	1 $\mu$ L		
H <sub>2</sub> O	1 $\mu$ L		
Volume total	10 $\mu$ L		

Tabela 23. Descrição da reação enzimática e condições reacionais para a confirmação e digestão da sequência codificadora da proteína N\_AM\_Hanta do vetor de expressão pGS.

## APÊNDICE D – Características sociodemográficas e econômicas da população total estudada

Características sociais, demográficas e econômicas	Positivos		Negativos		Valor de p <sup>1</sup>
	%	n	%	n	
<b>Município</b>					
Manaus	6,6	47	93,4	666	<b>p &lt;0,001</b>
Coari	16	103	84	539	
Itacoatiara	17,2	11	82,8	53	
<b>Gênero</b>					
Masculino	9,6	76	90,4	718	<b>p=0,022</b>
Feminino	13,6	85	86,4	540	
<b>Faixa etária (em anos)</b>					
18-19	8,2	8	91,8	90	<b>p=0,009</b>
20-29	12,4	56	87,6	394	
30-39	9,4	35	90,6	338	
40-49	11	29	89	235	
50-59	12,2	18	87,8	130	
60-69	14	7	86	43	
≥ 70	36,4	8	63,6	14	
<b>Cor da pele / raça</b>					
Branca	9,5	15	90,5	143	p=0,281
Negra	6,7	6	93,3	84	
Parda	12,1	111	87,9	804	
Amarela	3,7	1	96,3	26	
Indígena	-	-	100	26	
Negra x índia	6,7	1	93,3	14	
Branca x índia	7,7	1	92,3	12	
Branca x negra	14,3	2	85,7	12	
<b>Renda familiar mensal (em salários mínimos - SM)</b>					
Até 1 SM	15	92	85	520	<b>p&lt;0,001</b>
2 SM	7	23	93	309	
3 SM	7,3	10	92,7	126	
4 SM	12	12	88	88	
≥ 5 SM	7,8	10	92,2	118	
<b>Escolaridade</b>					
Analfabeto	16	12	84	63	p=0,206
Alfabetizado	10,3	3	89,7	26	
Ensino fundamental incompleto	14,7	41	85,3	238	
Ensino médio incompleto	14,6	13	85,4	76	
Ensino fundamental completo	9,9	7	90,1	64	
Ensino médio completo	10,1	51	89,9	455	
Superior incompleto	6,9	12	93,1	163	
Superior completo	9,8	17	90,2	157	
Não sabe	33,3	1	66,7	2	
<b>Ocupação</b>					
Desempregado	13,1	30	86,9	199	p=0,089
Altos funcionários de governo ou empresa	5,6	2	94,4	34	
Profissionais de nível superior	9,6	9	90,4	85	
Profissionais das artes	33,3	1	66,7	2	
Profissionais ou técnicos de nível médio	4,8	5	95,2	100	
Serviços administrativos	12,4	11	87,6	78	
Prestação de serviços e comerciários	11,1	22	88,9	176	
Serviços domésticos	15	17	85	96	
Trabalhadores agropecuários, florestais, caça e pesca	16,5	30	83,5	152	
Produção de bens e serviços industriais	11,6	8	88,4	61	
Trabalhadores manuais de construção civil	-	-	100	39	
Trabalhadores manuais de reparação e manutenção	4,8	1	95,2	20	
Membro das forças armadas, policiais e bombeiros	8	6	92	69	
Ocupações mal especificadas e trabalho informal	7,7	1	92,3	12	
Autônomo	9	7	91	71	
Estudante	5,9	1	94,1	16	
<b>Conhecimento sobre zoonoses</b>					
Não	13,1	113	86,9	748	<b>p=0,018</b>
Sim	8,4	34	91,6	371	
<b>Conhecimento sobre Hantavírus</b>					
Não	11,2	94	88,8	745	p=0,71
Sim	11,9	57	88,1	423	

Tabela 24. Prevalência para *Hantavírus* na população total segundo características sociais, demográficas e econômicas. p<sub>1</sub>= teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ). Medidas em negrito estão estatisticamente significativas (p≤0,05).

Possíveis fatores de risco	Positivo		Negativo		Valor de p <sup>1</sup>	RP <sub>b</sub> (IC 95%)
	%	n	%	n		
<b>Relacionado a roedores</b>						
Costuma caçar animais	13,2	24	86,8	158	0,53	1,1 (0,7-1,7)
Matou ou capturou roedores	14	41	86	252	0,18	1,2 (0,9-1,7)
Observou a presença de roedores na residência ou trabalho	12,5	90	87,5	627	0,35	1,1 (0,8-1,6)
Foi mordido por roedor ou outro animal	14,5	30	85,5	177	0,16	1,3 (0,9-1,9)
Comeu carne de roedor	13,3	46	86,7	299	0,32	1,2 (0,8-1,6)
<b>Relacionado a proximidade a área de florestamento</b>						
Visitou ou teve contato com floresta	11,8	84	88,2	629	0,61	1,1 (0,8-1,4)
Costuma visitar fazenda ou chácara	11,8	58	88,2	435	0,88	1 (0,7-1,4)
Costuma tomar banho em locais abertos ou rios	11,3	69	88,7	540	0,77	1 (0,7-1,3)
Costuma fazer passeios ou acampamentos em áreas florestadas	9,9	37	90,1	337	0,24	0,8 (0,6-1,1)
Tem gramado em volta da casa	10,2	33	89,8	289	0,68	0,9 (0,6-1,3)
Tem hortas, plantações ou árvores frutíferas em volta da casa	12,8	78	87,2	529	0,21	1,2 (0,9-1,6)
Mora perto de floresta ou fragmento de floresta	12,1	61	87,9	441	0,53	1,1 (0,8-1,5)
Mora ou trabalha perto de área de criação de animais	13,2	31	86,8	204	0,33	1,2 (0,8-1,7)
Participou de desmatamento	13,4	34	86,6	220	0,27	1,2 (0,8-1,8)
Trabalhou com agricultura	15,8	84	84,2	446	<b>&lt;0,001</b>	<b>1,8 (1,3-2,4)</b>
Mantém alimentos da colheita	16,6	36	83,4	181	<b>0,007</b>	<b>1,6 (1,2-2,3)</b>
Possui depósito ou galpão para armazenamento de grãos	18,2	22	81,8	99	<b>0,017</b>	<b>1,8 (1,1- 3)</b>
<b>Relacionado a saneamento básico</b>						
Não possui água encanada ou tratada em casa	13,1	28	86,9	186	0,39	1,2 (0,8-1,7)
Não possui rede de esgoto em casa	14,2	53	85,8	321	<b>0,05</b>	<b>1,4 (1-1,8)</b>

Tabela 25. Prevalência para *Hantavírus* na população total segundo fatores relacionados a contato com roedores, proximidade a área de florestamento e saneamento básico. p<sub>1</sub>= teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ). RP<sub>b</sub> = razão de prevalência bruta. IC 95% = Intervalo de Confiança 95%. Medidas em negrito estão estatisticamente significativas (p≤0,05).

## APÊNDICE F – Tampões e soluções

<b>Extração</b>	<b>Extração e purificação</b>	<b>Purificação</b>
Tampão A de lise  NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM Tris HCL 10 mM pH 8,0	Tampão B desnaturante  NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM TrisCl 10 mM Ureia 8 M pH 8,0	Tampão C de eluição  NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM TrisCl 10 mM Ureia 8 M Imidazol 500 mM Glicerol pH 8,0

Tabela 26. Tampões utilizados nos processos de extração e purificação na proteína N\_AM\_Hanta.

<b>Solução I – Diálise</b>	<b>Solução II – Diálise</b>
Tris HCL 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM Ureia 4 M pH 7,0	Tris HCL 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM Ureia 0,5 M pH 7,0

Tabela 27. Soluções utilizadas nos processos de diálise da proteína N\_AM\_Hanta.

<b>Solução de Tampão de Transferência – <i>Western Blotting</i></b>
28,85g Glicina 188 mM 6,06g Tris-base 25 mM 400 mL de Metanol q.s.p. 2L H <sub>2</sub> O destilada

Tabela 28. Tampão de transferência do processo de *Western Blotting*.

## APÊNDICE G – Lista de reagentes para ELISA

**LISTA DE REAGENTES PARA ELISA****1) PBS 1X**2,32 g NaHPO<sub>4</sub> 10mM

0,2 g KCl 2,7 mM

0,2 g K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM

8,0 g NaCl 137 mM

q.s.p. 1L água MilliQ

pH 7,4

**obs.:** preparação prévia de PBS 10X com pH 7,4, em seguida diluir a partir desse para PBS 1X

**2) SOLUÇÃO DE LAVAGEM (PBS-T 0,05%)**

PBS 1X + 0,05% de Tween 20 (PBS-T)

**3) SOLUÇÃO DILUIÇÃO DO ANTÍGENO (BICARBONATO/CARBONATO) 0,05M**2,65 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>2,1g NaHCO<sub>3</sub>

qsp 500 ml água MilliQ

pH 9,6

**obs.:** manter a 4°C

**4) SOLUÇÃO DE BLOQUEIO (LD10%)**

10% leite desnatado (LD 10%) em PBS pH 7,4

**obs.:** sempre preparar no dia do procedimento

**obs.2:** durante procedimento, manter esse reagente a 4°C para prevenir contaminação do leite

**5) SOLUÇÃO DE DILUIÇÃO DE ANTICORPO (PBS-T + LD10%)**

PBS pH 7,4

+ 0,05% de Tween 20 (PBS-T)

+ leite desnatado 10% (LD 10%)

**obs.:** sempre preparar no dia do procedimento

**obs.2:** durante procedimento, manter esse reagente a 4°C para prevenir contaminação do leite

Tabela 29. Soluções e tampões utilizados durante processo ELISA.

## 12 ANEXOS

### ANEXO 1 – Documento de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Soroprevalência para Hantavírus em humanos e animais do Estado do Amazonas

**Pesquisador:** Pritesh Jaychand Lalwani

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 19328313.7.0000.5020

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 569.240

**Data da Relatoria:** 26/03/2014

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de Recurso ao Parecer do CEP 522021 de 05/02/2014 17:30:46. O projeto pertence à Grande Áreas do Conhecimento (CNPq) Grande Área 4. Ciências da Saúde. O pesquisador responsável é o Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani, pesquisador da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). O projeto é um estudo observacional de corte transversal sobre a soroprevalência de hantavírus em humanos e animais e que espera desenvolver um teste diagnóstico para hantavírus, viável e baixo custo que poderá ser empregado nos centros de saúde pública. Este projeto, espera tanto ajudar no entendimento da epidemiologia do hantavírus no Amazonas, quanto contribuir para o desenvolvimento de um novo teste diagnóstico para hantavírus .

##### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Hantavirose constitui um problema de saúde pública emergente no Estado do Amazonas. Contudo, ainda não é conhecida a prevalência e os fatores de risco para hantavirose no Amazonas. O objetivo desse estudo é conhecer o perfil epidemiológico da hantavirose na população do Amazonas e desenvolver um teste diagnóstico para hantavírus a ser empregado nos centros de saúde pública.

**Endereço:** Rua Teresina, 4950  
**Bairro:** Adrianópolis **CEP:** 69.057-070  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3305-5130 **Fax:** (92)3305-5130 **E-mail:** cep@ufam.edu.br

## ANEXO 2 – Questionário epidemiológico e socioeconômico para população investigada



Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

### QUESTIONÁRIO

UFAM

Nome: \_\_\_\_\_

1. Endereço: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

2. Bairro/ Comunidade: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

3. Há quanto tempo você mora nesta área? \_\_\_\_\_

4. Idade: \_\_\_\_\_ Gênero/Sexo:  Masculino  Feminino

5. Qual seu Grupo Sanguíneo: \_\_\_\_\_ RH:  Positivo  Negativo

6. Como você classifica a cor de sua pele/raça?

- Branco  Negro  Pardo  Amarelo  Indígena  
 Negro x índio  Branco x índio  Branco x negro

7. Qual o seu nível de escolaridade?

- Analfabeto  Ensino fundamental completo  
 Alfabetizado  Ensino médio completo  
 1ª a 4ª série do ensino fundamental  Superior incompleto  
 5ª a 8ª série do ensino fundamental  Superior completo  
 1ª a 3ª série do ensino médio  Não sabe

8. Renda Familiar:  até 1 salário  2 salários  3 salários  4 salários  5 ou mais

9. Você trabalha?  Sim  Não

10. Nos últimos 12 meses, qual foi sua principal ocupação? [Entrevistador: com a ajuda do entrevistado, classifique a ocupação no grupo ocupacional mais adequado]

- Não tinha. Estavas desempregado (a)  
 Altos funcionários do governo, dirigentes, gerentes ou altos funcionários de empresa  
 Profissionais de nível superior  
 Profissionais das artes  
 Profissionais ou técnicos de nível médio  
 Trabalhadores de serviços administrativos  
 Trabalhadores da prestação de serviços e comerciários  
 Trabalhadores de serviços domésticos  
 Trabalhadores agropecuários, florestais de caça e pesca  
 Trabalhadores manuais (produção de bens e serviços industriais)  
 Trabalhadores manuais da construção civil  
 Trabalhadores manuais de reparação e manutenção  
 Membros das forças armadas, policiais e bombeiros militares  
 Ocupações mal especificadas do trabalho informal (ambulante, manobrista, guardador de carro...)  
 Autônomo: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

11. Você tem algum problema de saúde que lhe impede de trabalhar ou fazer exercícios?

- Sim  Não

12. Quantas crianças tem na sua casa?  0  1  2  3  4ou+

13. Faz uso de bebida alcoólica?  Sim  Não Se SIM, que frequência? \_\_\_\_\_/semana

14. Você fuma?  Sim  Não Se SIM, que frequência? \_\_\_\_\_/semana

15. Já esteve internado?  Sim  Não

Qual especialidade?  Cardiologia  Oftalmologia  Neurologia  
 Outras: \_\_\_\_\_  Infectologia  Pneumologia  Cirurgia  
 Angiologia  Nefrologia  Clínica da Dor

16. Você é usuário do SUS?  Sim  Não

17. Possui algumas dessas patologias abaixo?  Sim  Não

Quais?  Hipertensão  Diabetes  Obesidade  
 Lúpus  Câncer  Outras: \_\_\_\_\_

18. Você já teve alguma das doenças a abaixo?

Dengue  Febre hemorrágica  Giardíase  Leishmaniose  Leptospirose  
 Malária  Pneumonia  Rubéola  Toxoplasmose  Vermes

19. Já ouviu falar sobre Hantavírus?  Sim  Não

Se SIM, qual (is) fonte(s) de informação:

TV  Rádio  Amigos/família  Serviço de saúde  Palestra  Outros:

**E como se pega Hantavírus?**

Doenças transmitidas por roedores  Doença transmitida pelo cão  
 Doença transmitida por mosquito  Doença transmitida por água  
 Não sabe  Outros: \_\_\_\_\_

**20. Informação sobre animais domésticos e contato/caça com roedores**

a) Você tem animais em casa?  Sim  Não

-Quais? (quantidade/idade)?  Cão \_\_\_\_/\_\_\_\_  Gato \_\_\_\_/\_\_\_\_  Ave \_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Peixe \_\_\_\_/\_\_\_\_  Outro \_\_\_\_\_/\_\_\_\_

b) Leva seu animal ao veterinário?  Sim  Não

c) Seu animal tem muita infestação de carrapatos?  Sim  Não

d) Seu animal tem muita infestação de pulgas?  Sim  Não

e) Seu(s) animal (is) costuma(m) capturar e/ou comer ratos?  Sim  Não

f) Costuma caçar animais?  Sim  Não

g) Mata ou captura roedores?  Sim  Não

h) Já observou a presença de sinais visíveis de roedores na sua residência ou seu no trabalho?  Sim  Não

- Se SIM, quais?  Fezes  Materiais roídos  Pegadas  
 Odor característico  Presença própria do animal  Tocas

i) Já foi mordido por algum roedor ou outro animal?  Sim  Não Se for outro animal, qual(is)? \_\_\_\_\_

j) Usa ratos como isca para a pesca?  Sim  Não

k) Já comeu carne de roedores?  Sim  Não

l) Você cria cobras?  Sim  Não

m) Costuma alimentá-las com animais vivos?  Sim  Não

Você se preocupa com as doenças que os animais transmitem para os humanos? Sim  Não

Sabe o que são zoonoses? Sim  Não

### 21. Informação sobre contato com área de florestamento

- a) Você visitou ou teve contato com floresta?  Sim  Não  
 - Quando?  Últimos 6 meses  Há 1 ano  Há 2 anos  Há 5 anos
- b) Costuma visitar fazenda ou xacara?  Sim  Não
- c) Costuma tomar banho em locais abertos ou tem o hábito de ir a áreas de banhos em rios?  Sim  Não
- d) Costuma fazer passeios ou acampamentos em áreas de floresta?  Sim  Não
- e) Tem gramado em volta de sua casa?  Sim  Não
- f) Há hortas, plantações ou árvores frutíferas em volta da casa?  Sim  Não  
 - se SIM, qual a distância?  menos de 500 metros  mais de 500 metros
- g) Mora perto da floresta ou fragmentos de floresta?  Sim  Não  
 - se SIM, qual a distância?  menos de 500 metros  mais de 500 metros
- h) Mora ou trabalha perto de áreas de criação de animais (aviários, suínos, bovinos, caprinos, etc)?  Sim  Não
- i) Já participou de algum desmatamento na floresta?  Sim  Não  
 - se SIM, quando?  últimos 12 meses  mais de 12 meses
- j) Já trabalhou com agricultura?  Sim  Não  
 - se SIM, quando?  últimos 12 meses  mais de 12 meses
- k) Mantém em casa muitos alimentos da colheita?  Sim  Não
- l) Possui depósito ou galpão para armazenamento de grãos ou produtos da colheita em casa?  Sim  Não

### 22. Informação sobre limpeza

	Diariamente	Dias alternados	1/semana	2/semana	3/semana	Cada 15dias	Outro	Ignorado
Limpeza da casa								
Limpeza da área externa								
Descarte do lixo								

- Usa luvas para limpeza da casa e quintal?  Sim  Não
- Costuma limpar a mesa após as refeições?  Sim  Não
- Acumula entulho/lixo ao redor ou fora da casa?  Sim  Não
- Lixo aberto ou mal acondicionado?  Sim  Não
- Usa sabão para lavar as mãos?  Sim  Não
- Caso tenha, limpa a churrasqueira após o uso?  Sim  Não

23. A sua casa possui água encanada e tratada?  Sim  Não

24. A sua casa possui esgoto?  Sim  Não

**25. Qual a estrutura da sua casa?**

**Tipo de parede:**  Blocos de cimento  Argila ou blocos de barro  Tijolo de fogo  
 Pedra e cimento  Pedra e lama  Madeira e lama  \_\_\_\_\_

**Tipo de telhado:**  Palha  Telha  Zinco  Lona/toldo  \_\_\_\_\_

**26. Tem muito mosquito/carapanã/muriçoca onde você mora?**  Sim  Não**27. Informações das características do mosquito****Qual o criadouro mais comum?**

Água parada limpa  Água corrente limpa  Plantas/vegetações  Não sabe  
 Água parada suja  Água corrente suja  Lixo  Outros: \_\_\_\_\_

**Qual o tempo de picada mais frequente?**

Pôr do sol/escurecer  Manhã  Meio-dia  Não sabe  
 Nascer do sol/amanhecer  Noite  Outros: \_\_\_\_\_

**28. Você realiza as medidas preventivas contra o mosquito da dengue conforme as Campanhas em Saúde divulgam?**  Sim  Não**29. Se sim, algumas informações das medidas preventivas contra o mosquito.****- Qual tipo de prevenção utilizada contra a picada do mosquito?**

Casa limpa  Cremes e repelentes  Cobertura do corpo com roupas  
 Educação contínua  Evitar água parada  Fumaça para dispersar  
 Higiene pessoal  Janela fechada  Limpeza de lixo  
 Líquido vaporizador  Mosquiteiro (cama)  Spray  
 Tela de janela e porta  Ventilador  
 Outros: \_\_\_\_\_  Não sabe

**- Erradicação/extinção do criadouro do mosquito?**

Água em tanques de armazenamento  Cobertura dos recipientes   
 Outros: \_\_\_\_\_  
 Prevenção de água parada  Corte de árvores/vegetais  Não sabe

**30. Você já teve Malária?**  Sim  Não**31. Você já teve Dengue?**  Sim  Não**32. Você já tomou vacina contra Febre Amarela?**  Sim  Não  Não sabe

**Mais informações:**

---



---

**OBRIGADO PELA COLABORAÇÃO!**

## ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



**Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Termo de Consentimento livre e Esclarecido (TCLE)**

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa chamada: **“Soroprevalência para Hantavírus em humanos e animais do Estado do Amazonas”**, realizada por pesquisadores da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

A hantavirose é a doença causada pelo hantavírus e geralmente transmitida por ratos silvestres. Dessa maneira, os moradores de áreas rurais, agricultores, caçadores, pescadores, pessoas que fazem trilhas, acampam ou frequentam matas são as que têm mais chance de se contaminar com o hantavírus. Existem apenas cinco casos de hantavirose identificados no Amazonas até o momento. Por esse motivo, estamos realizando um estudo para conhecer a verdadeira importância dessa doença para o seu município, procurando anticorpos para o hantavírus no sangue de pessoas adultas (mais de 18 anos) e animais.

A sua participação nesta pesquisa consiste em permitir a coleta de 5 mL de sangue da veia, com o uso de agulha e seringa descartáveis, além de responder a um questionário com dados epidemiológicos. O seu sangue será estudado nos laboratórios da UFAM e poderá ser guardado para futuras pesquisas, se você permitir. Os exames realizados no seu sangue servem para diagnosticar apenas a hantavirose.

Caso você possua animais em sua casa (cães ou gatos), se você permitir, também serão coletados 5 mL do animal para pesquisar hantavirose, também nos animais.

Os riscos relacionados com sua participação são a dor causada pela picada da agulha e um pequeno sangramento que pode acontecer após a coleta de sangue. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal treinado e experiente na coleta de sangue e com a adoção rigorosa dos procedimentos padrão de biossegurança para a coleta de sangue. O único benefício relacionado com a sua participação é o de nos ajudar a conhecer essa doença no seu município e as situações de risco para sua transmissão e assim evitar que novos casos aconteçam.

A sua participação neste estudo é voluntária, não implicando em qualquer custo para você. A qualquer momento você pode desistir de participar e isso não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a UFAM. Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento.

O material coletado (amostra de sangue) será armazenado por até 10 anos e se o Sr(a) autorizar abaixo poderá ser utilizado em estudos posteriores desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual.

Por isso, pedimos que o Sr(a). se manifeste abaixo sobre o armazenamento e uso da sua amostra de sangue em estudos posteriores.

Não, a minha amostra não deverá ser armazenada.

Sim, concordo que a minha amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores.

Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo sobre a necessidade de ser consultado para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:

Não quero ser consultado, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso de minha amostra no novo projeto de pesquisa. !

Rubricas/ Polegar

Também em caso de concordar com o armazenamento da sua amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores, é possível ainda que sua identidade seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituídos por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a sua identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a sua amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim o Sr.(a) não teria os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa. Um benefício de sua participação neste estudo é a contribuição para o conhecimento científico na área da saúde e doenças infecciosas.

Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação de sua identidade da amostra de sangue e dados:

Não, a minha identidade não pode ser desvinculada da amostra e dados

Sim, concordo que minha identidade seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Você receberá uma cópia deste termo. Logo abaixo, você tem o nome, telefone e o endereço do pesquisador principal que poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação quando você desejar.

**Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.**

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador responsável

Assinatura do Participante

**Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani**  
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
 Universidade Federal do Amazonas  
 Rua Alexandre Amorin, 330 - Aparecida  
 Manaus-AM-Brasil CEP 69010-300  
 Fone: +55 92 3305 5000  
 E-mail: pritesh@ufam.edu.br



Assinatura alternativa  
 (Impressão do dedo polegar)