UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS

NEDJA POLIANE TORRES MEDEIROS

INQUÉRITOS SOROLÓGICOS PARA HANTAVÍRUS NO ESTADO DE ALAGOAS

Maceió - AL

2013

NEDJA POLIANE TORRES MEDEIROS

INQUÉRITOS SOROLÓGICOS PARA HANTAVÍRUS NO ESTADO DE ALAGOAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Alessandra Abel Borges.

Maceió - AL

2013

Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

M488i Medeiros, Nedja Poliane Torres.
Inquérito sorológico para hantavírus no estado de Alagoas / Nedja Poliane Torres Medeiros. – 2013.
114 f. : il.

Orientadora: Alessandra Abel Borges.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 82-106.

1. Hantavírus – Alagoas. 2. Inquérito sorológico. 3. Anticorpos IgG. I. Título.

CDU: 616.98:612.017

Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – *Campus* A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Defesa da Dissertação de Mestrado da mestranda Nedja Poliane Torres Medeiros, intitulada: "Inquéritos sorológicos para hantavírus no Estado de Alagoas", orientada pela Prof.ª Dr.ª Alessandra Abel Borges, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 28 de junho de 2013.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata APROVADA.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Celso Tavares – (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Silvana Ayres Martins - (UFAL)

Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana – (FCFRP-USP)

A minha família pelo carinho e apoio incondicional.

Aos meus pais: Paulo e Neusa, pela dedicação e esforços desprendidos possibilitando esta realização.

Aos meus irmãos: Rosa Lúcia, Paulo Junior, Daiane, Adriana, Ana Paula e Maria Vitória, pela torcida e carinho. A minha sobrinha/afilhada Maria Luísa que mesmo ainda não entendendo muito sempre esteve pronta a ajudar com um belo sorriso no rosto.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a realização deste trabalho e estando sempre comigo não me deixou desanimar, colocando no meu caminho pessoas amigas, verdadeiros anjos.

À professora Dr[a] Alessandra Abel Borges, por aceitar a orientação, pela atenção e por dividir um pouco do seu conhecimento comigo.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Virologia e Imunologia, LAPEVI, pelo empenho e ajuda incondicional, estando sempre dispostos, independentemente de dias e horários e ainda pela compreensão nos momentos difíceis e de estresse. Em especial, quero agradecer à Rebeka Feitosa por dedicar parte de suas férias de janeiro em treinamentos. À Jhassyara e Wanessa por estarem sempre ao meu lado e me ajudarem de forma direta na realização dos testes ou nas "aventuras" pelo interior do estado em busca de amostras. Ao Danilo pela preocupação com a manutenção da ordem e ajuda nas etapas pré-teste. À Patrícia e Janille Botelho pela ajuda nas coletas sanguíneas e Juliana com as alíquotas. Ao Junior pelas dicas e conselhos para a realização dos inquéritos e a Grazi, que mesmo não fazendo mais parte da equipe, foi de uma prontidão e delicadeza imensurável no inquérito em Olho D'Água do Casado.

Ao Centro de Pesquisa em Virologia, na pessoa do professor Luís Tadeu Figueiredo, pelo auxilio com reagente, cedendo às primeiras alíquotas de proteína N.

A todos que permitiram a presença da equipe LAPEVI em suas dependências. À direção da Usina Coruripe e todos seus colaboradores, à direção da Cooperativa de Produtores Agrícolas de Palmeira dos Índios, na pessoa do Sr. Leonardo e sua secretária Arlete; e ao Sr. Marcelino (técnico em saneamento) que viabilizou o contato com o Sr. Cícero, líder comunitário no assentamento Nova Esperança em Olho D'Água do Casado, bem como sua esposa.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas (LACEN), na pessoa do Magliones, que nos auxiliou no contato inicial com a Usina Coruripe.

A todos os trabalhadores rurais que aceitaram, de forma voluntária, participar desta pesquisa, o meu eterno agradecimento.

A todos os colegas de trabalho pela compreensão nos momentos de ausência dedicados a este trabalho. Especialmente agradeço aos coordenadores administrativos Walberto,Gilvan e Quitéria (em memória) que compraram a briga e me apoiaram.

Aos colegas de mestrado, pelo apoio e ombro amigo nas horas difíceis, pelas risadas e momento de descontração. Sobretudo a Larissa pela sua disposição e amizade irrestrita, me ajudando, ainda, com contatos importantes para o desenvolvimento deste trabalho; ao Paulo Sérgio, o Paulinho, que com seu jeito amigo e descontraído conseguia facilmente resolver as

situações mais adversas; à Rita que apesar de toda a sua correria sempre esteve disposta a colaborar da melhor forma possível; e ao Mário pela sua paciência e parceria apesar das adversidades.

Ao Allan pelo auxilio nos momentos de dificuldade.

Ao seu Pedro, pai da Patrícia, pelo seu envolvimento e disposição nas coletas em Palmeira dos Índios.

Ao Jhonys, irmão da Jhassyara, com a ajuda na elaboração do mapa de Alagoas.

Aos laboratórios que compõe o ICBS/UFAL por toda ajuda com empréstimo de equipamentos, em especial aos professores Drs Antônio Valeriano Pereira dos Santos, Daniel Leite Goés Gitaí e Denise Maria Wanderlei Silva.

A todos os amigos que me apoiaram e incentivaram nessa caminhada, de modo especial a Alânio Tavares, que sempre se fez presente dando sua cota de incentivo.

A Melânia ex-secretária e ao Jonatan atual secretário da pós-graduação pela ajuda, sanando as diversas dúvidas.

Aos professores do PPGCS por dividirem um pouco do seu conhecimento e assim contribuir com o processo de aprendizagem.

Aos servidores da Universidade Federal de Alagoas, UFAL, que de forma direta ou indireta contribuíram com o desenvolvimento desta pesquisa. Em particular, ao seu Sebastião, o Tião, motorista da universidade pela disposição e boa vontade, a quem eu devo, em parte, algumas das amostras obtidas no Sertão alagoano.

A equipe de limpeza dos laboratórios, "Galego" e Maria que sempre estiveram de prontidão.

A Universidade Federal de Alagoas pelo espaço físico no qual foi desenvolvida esta pesquisa.

-Meu muito obrigada a todos que sempre foram extremamente solícitos e atenciosos, sem os quais este trabalho não teria se concretizado.

“Ninguém nunca disse que seria fácil, mas simplesmente que valeria a pena.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

Os hantavírus são vírus zoonóticos, pertencentes à família *Bunyaviridae* e estão distribuídos em todo o mundo. Possuem como material genético RNA e nas Américas são abrigados em roedores da subfamília Sigmodontidae, os quais se comportam como reservatórios. No ser humano, as formas de infecção por hantavírus incluem apresentações clínicas que variam de formas leves da doença até quadros mais graves, com o desenvolvimento da Síndrome Pulmonar Cardiovascular por Hantavírus (SPCVH). Os hantavírus são transmitidos por meio da inalação de aerossóis formados das excretas de roedores silvestres infectados. No Brasil, casos de SPCVH têm sido registrados em todo país, acometendo principalmente trabalhadores rurais. No entanto, são poucos os registros na Região Nordeste. Até o momento, o estado de Alagoas não possui registro de SPCVH, embora apresente condições favoráveis à circulação de hantavírus, como por exemplo: a substituição de Mata Atlântica pela cultura da cana-de-açúcar, na Mesorregião do Leste; o cultivo do milho, no Agreste e o clima seco presente na Mesorregião do Sertão alagoano. Assim, este estudo teve por objetivo levantar evidências da ocorrência de infecções humanas por hantavírus nas diferentes mesorregiões do estado de Alagoas. Para tanto, foi realizado inquérito sorológico em indivíduos saudáveis de três municípios das mesorregiões alagoanas: Coruripe, Mesorregião do Leste; Palmeira dos Índios, Agreste; e Olho D'Água do Casado, Sertão, nas quais foram coletadas amostras de soro dos participantes para a pesquisa de anticorpos IgG contra a proteína N recombinante do hantavírus *Araraquara* (rN ARAV) através do ensaio imunoenzimático (ELISA) e dados epidemiológicos foram obtidos por meio da aplicação de questionários. As amostras foram consideradas positivas quando obtiveram títulos iguais ou acima de 200. Neste estudo foi incluído um total de 928 indivíduos, com média de idade de 35 anos (sd=16,62), mediana de 32 anos. Da mesorregião do Leste, participaram 704 voluntários, dos quais 54 possuíam anticorpos anti-rN ARAV (prevalência de 7,67%). No Agreste, participaram 155 voluntários, destes 3 possuíam os anticorpos pesquisados (prevalência de 1,94%). No Sertão, foram incluídos 69 participantes, dos quais 2 foram sororreagentes (prevalência de 2,9%). No total, a prevalência foi de 6,36% (59/928), com títulos de 200 a 3.200. Entre os sororreagentes, 72,35% relataram nunca ter estado em outro estado e 11,86% afirmaram ter sofrido de doença com insuficiência respiratória. O contato antigênico do ser humano com hantavírus induz anticorpos IgG de longa duração, ainda que não venha a desenvolver a SPCVH durante a infecção aguda. Os achados deste estudo indicam a ocorrência de infecções autóctones por hantavírus em Alagoas, inclusive entre indivíduos com história de doença respiratória no passado. Deste modo, tomados em conjunto, estes achados sugerem a circulação de hantavírus no estado e a ocorrência de infecções silenciosas, com sintomatologia inaparente ou ainda sintomática, mas sem diagnóstico. Este é o primeiro estudo que demonstra evidência sorológica de infecção humana pregressa por hantavírus nas três mesorregiões alagoanas, trazendo novos dados à epidemiologia da hantavirose no Nordeste.

Palavras-chave: Hantavírus. Estado de Alagoas. Inquérito Sorológico. Anticorpos IgG.

ABSTRACT

Hantaviruses are rodent-borne enveloped RNA-viruses belonging to *Bunyaviridae* family that have worldwide distribution and are shelter in Sigmodontinae subfamily in America. Hantavirus have been identified as etiologic agents of infection human, which can range from mild disease to severe disease, such as Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome (HPCS). Human infection is acquired by inhanalation of aerosols containing excreta of rodents infected by hantavirus. However, there are few records in the Northeast. So far, in the Alagoas State, to date there is no reports of hantavirus infections, although with conditions favorable to circulation of hantavirus, for example: substitution of Atlantic Florets for sugar agro cane industry, in East Mesoregion; corn culture, in Agreste; and the dry climate in the Sertão Mesoregion. The aim this study it was to collect evidence of the occurrence of human hantavirus infections in different mesoregions Alagoas State. Sera of volunteers healthy were collected and used to detect IgG antibodies against a recombinant N protein of *Araraquara* hantavirus (rN ARAV), by enzyme immunoassay (ELISA), as well as epidemiological data were obtained by questionnaires. The samples were considerated positive when titers were equal or greater of 200. In this study was included 928 individuals, mean age 35 years (sd=16.62), with median of 32 years. From the East Mesoregion, 704 volunteers participated, of which 54 had anti-rN ARAV (prevalence of 7.67%). In Agreste, 155 volunteers participated, of these, three had these antibodies. In the Sertão Mesoregion, 69 participants were included, of which 2 were serum-reactive. The global prevalence was 6.36% (59/928), wich titers ranged from 200 to 3,200. Of soropositive volunteers, 72.35% of them attested that had never lived and 11.86% said that developed disease with respiratory failure. The human antigenic contact with hantavirus induces long term IgG antibodies, even that when the HPCS development were not occurred during the acute infection. The results of this study indicated the occurrence of local infections by hantavirus in Alagoas State, including in individuals without respiratory disease history in the past. Thus, taken together, these findings suggest the circulation of hantavirus in Alagoas State and the occurrence of silent infections, both inapparent or symptomatic infections but without diagnosis. This is the first study to demonstrate serological evidence of past human infections by hantavirus in individuals from three mesoregions of Alagoas State. Our findings provide new insights into the epidemiology of hantaviruses in the Northeast Region from Brazil.

Key words: Hantavirus. Alagoas State. Sorological Survey. IgG antibodies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição dos hantavírus nas Américas segundo a patogenicidade. 20

Figura 2- Estrutura dos hantavírus. 21

Figura 3- Representação esquemática dos segmentos genômicos dos hantavírus. 22

Figura 4- Ciclo replicativo dos hantavírus. 24

Figura 5- Modo de transmissão das Hantaviroses. 27

Figura 6- Evidência de hantavírus no Brasil. 41

Figura 7- Mapa de Alagoas (A) com indicação das mesorregiões e localização dos municípios onde foram realizadas as coletas para os inquéritos sorológicos para hantavírus (destacados com preenchimento em preto) e imagem de satélite demonstrando as diferenças na vegetação do estado (B). 50

Figura 8- Fotos das palestras de esclarecimento e coletas. 54

Figura 9- Representação esquemática do ensaio imunoenzimático, ELISA, para detecção de anticorpos anti-hantavírus. 56

Figura 10- Representação esquemática da distribuição dos soros em placa de poliestireno frente ao teste ELISA. 56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Hantavirose, casos e taxa de letalidade. Brasil, 1993 a 2012. 40

Gráfico 2- Proporção da participação de trabalhadores rurais de cada município no inquérito sorológico para hantavírus no estado de Alagoas. 59

Gráfico 3- Média de idades de todos os participantes dos inquéritos sorológicos para hantavírus em Alagoas. 59

Gráfico 4- Total de participantes (positivos e negativos) e percentagem de amostras sororreagentes, segundo a faixa etária, no Inquérito em Coruripe. 64

Gráfico 5- Histórico de trabalho desenvolvido em outros estados relatado pelos participantes com resultado positivo para a pesquisa de anticorpos IgG anti-hantavírus do inquérito em Coruripe (A) e percentagem destes participantes que afirmaram já terem estado em outros estados (B). 65

Gráfico 6- Histórico de tipo de contato com roedor dos participantes reagentes para a pesquisa de anticorpos IgG anti-hantavírus no Inquérito em Coruripe (A) e tipos de contato com roedores mais frequentes entre as respostas (B). 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Espécies de roedores, subfamília *Sigmodontinae,* reservatórios de variantes de hantavírus no Brasil e sua distribuição geográfica. 31

Tabela 2- Casos confirmados de Síndrome Pulmonar Cardiovascular por Hantavírus no Brasil de 1993 a 2012*. 38

Tabela 3- Óbitos por Síndrome Pulmonar Cardiovascular por Hantavírus no Brasil. Brasil de 1993 a 2012* 39

Tabela 4- Características gerais dos participantes dos inquéritos em Alagoas. 58

Tabela 5- Casos reagentes para anticorpos IgG anti-hantavírus, em trabalhadores rurais da Usina Coruripe/AL, segundo o código de registro do participante voluntário, título, idade, trabalhos realizados em outros estados, presença de doença grave com sintoma respiratório, residência em outros estados e ocorrência de doença crônica. 60

Tabela 6- Títulos reagentes para anticorpos IgG anti-hantavirus, em trabalhadores rurais da Usina Coruripe. 63

Tabela 7- Povoados de origem das amostras do município de Palmeira dos Índios. 66

Tabela 8- Casos reagentes para anticorpos IgG anti-hantavírus, em indivíduos de Palmeira do Índios, segundo o código de registro do participante voluntário, título, idade, trabalhos realizados em outros estados, presença de doença grave com sintoma respiratório, residência em outros estados e ocorrência de doença crônica. 67

Tabela 9- Casos reagentes para anticorpos IgG anti-hantavírus, em indivíduos do município de Olho D'Água do Casado,segundo o código de registro do participante voluntário, título, idade, trabalhos realizados em outros estados, presença de doença grave com sintoma respiratório, residência em outros estados e ocorrência de doença crônica. 68

Tabela 10- Títulos reagentes para anticorpos IgG anti-hantavírus, em 928 trabalhadores rurais do estado de Alagoas, e as respectivas D.O.s médias obtidas em cada título. 69

Tabela 11- Prevalência de anticorpos anti-hantavírus nas populações das três mesorregiões do estado de Alagoas. 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico]
ANDV	Vírus *Andes*
BCC	Vírus *Black Creek Canal*
CID	Classificação Internacional de Doenças
CGDT	Coordenação Geral de Doenças Trasnmissiveis
CPV	Centro de Pesquisa em Virologia
DC	Células dendríticas
DEVEP	Departamento de Vigilância Epidemiológica
D.O.	Densidade óptica
s.d.	Desvio-padrão
ECMO	Oxigenação por membrana extracorporea
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
EV	Endovenosa
FHSR	Febre Hemorrágica com Síndrome Renal
GPC	Glicoproteína precusora
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICBS	Instituto de Ciências Biolócias e da Saúde
HTNV	Vírus *Hantaan*
IL	Interleucina
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
LAPEVI	Laboratório de Pesquisa em Virologia e Imunologia
LPD	Leite em pó desnatado
MPRLV	vírus *Maporal*

MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
NaCl	Cloreto de Sódio
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
Na_2HPO_4	Fosfato dissódico
Na_2HPO_4. H_2O	Fosfato dissódico hidratado
NYV	Vírus *New York*
PBS	Tampão fosfato-salino
PE	Estado de Pernambuco
PBS-T	Tampão fosfato-salino com Tween 20
PHV	Vírus *Prospect Hill*
p.i.	Período de infecção
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
rN ARAV	Proteína N recombinante do hantavírus Araraquara
RNAv	Ácido ribonucleico viral
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com trascrição reversa
SEOV	Vírus *Seoul*
SPCVH	Síndrome Pulmonar Cardiovascular por Hantavírus
SINAN	Sistema de Informações de gravos de Notificações
SNV	Vírus *Sin Nombre*
SVS	Secretária de Vigilância em Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	Fator transformador de crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **16**

2.1 Breve Histórico **18**

2.2 Hantavírus: taxonomia e estrutura viral **20**

2.3 Replicação **23**

2.4 A Transmissão **25**

2.5 Os reservatórios **28**

2.6 A infecção **33**

2.7 Resposta imunológica **35**

2.8 Hantaviroses no Brasil **37**

2.8.1 Diagnóstico da SPCVH no Brasil **41**

2.9 Hantavirose na Região Nordeste **42**

2.9.1 As mesorregiões de Alagoas **44**

3 JUSTIFICATIVA **47**

4 OBJETIVO **48**

4.1 Objetivo Geral **48**

4.2 Objetivos Específicos **48**

5 METODOLOGIA **49**

5.1 Aspectos éticos **49**

5.2 Áreas de estudo **49**

5.2.1 Município de Coruripe **51**

5.2.2 Município de Palmeira dos Índios **51**

5.2.3 Município de Olho D'Água do Casado **52**

5.3 Tipo de estudo **52**

5.4 População em estudo **52**

5.5 Coleta de amostras séricas e dados epidemiológicos. **53**

5.6 Análise sorológica **54**

5.7 Elisa Semi-Quantitativo **57**

5.8 Análise estatística **57**

6 RESULTADOS **58**

6.1 Inquérito sorológico em Coruripe **60**

6.2 Inquérito sorológico em Palmeira dos Índios **66**

6.3 Inquérito sorológico em Olho D'Água do Casado **67**

6.4 Resultados globais dos inquéritos sorológicos em Alagoas **69**

7 DISCUSSÃO **71**

8 CONCLUSÕES **81**

REFERÊNCIAS **82**

APÊNDICES **107**

ANEXO **113**

1 INTRODUÇÃO

As doenças emergentes preocupam cientistas e autoridades sanitárias em todo o mundo e são, em grande parte, fruto de alterações no ecossistema e dos comportamentos econômicos, sociais e culturais do homem (CABELO & CABELO, 2008; CAMPOS et al., 2009; HJELLE et al., 2010). Estas doenças surgem como importante problema de saúde pública, tanto nas zonas rurais como nas urbanas. Dentre aquelas que despertam especial preocupação estão as febres hemorrágicas, como é o caso da hantavirose e em especial a Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavírus (SPCVH), devido ao seu caráter altamente letal e a sua ocorrência em praticamente todo o continente americano (CAMPOS et al., 2009).

A infecção por hantavírus ocorre, na maior parte dos casos, em áreas rurais com altas densidades de roedores-reservatórios (galpões de armazenamento de grãos, sótãos e porões), durante acampamentos em áreas com a presença de roedores ou em zonas periurbanas com grande aglomeração populacional infestada por roedores que compartilham espaço e alimento com a população (LEDUC, 1987; VITEK et al., 1996). Ainda, distúrbios ambientais contribuem para a disseminação da hantavirose, uma vez que diminuem a diversidade das espécies e simplificam o ecossistema local, favorecendo a aproximação de roedores-reservatórios dos vírus (CARROLL et al., 2005; CASTILLO ORE´ et al., 2012, HEYMAN et al., 2012), o que favorece que um animal infectado possa transmitir o vírus para outro roedor não infectado.

A incidência da infecção humana por hantavírus no Brasil é provavelmente subestimada devido, em parte, às características clínicas semelhantes com uma variedade de doenças, incluindo leptospirose, síndrome da angústia respiratória aguda e pneumonia atípica (CAMPOS et al., 2009). Ainda, é sabido da existência de casos de indivíduos infectados por hantavírus que desenvolvem forma mais branda da doença e até infecções assintomáticas (ARMIEN et al., 2011). Além disso, têm sido repetidamente encontradas evidências de infecção por hantavírus em regiões do Brasil com poucos ou nenhum caso relatado para SPCVH, através de inquéritos sorológicos humanos, indicando a presença do vírus e a existência de infecções não diagnosticadas ou subclínicas (FIGUEIREDO et al., 2000; CAMPOS et al., 2009; LIMA et al., 2011).

Deste modo, tais observações levantam a hipótese de que casos da SPCVH possam estar ocorrendo em áreas não endêmicas – a exemplo do estado de Alagoas, considerado região epidemiológica silenciosa para esta doença. Este apresenta condições favoráveis à proliferação de roedores silvestres, como a economia apoiada na indústria sucroalcooleira e ocorrência de áreas de desmatamento. Nesse caso, pacientes com SPCVH em Alagoas poderiam estar recebendo tratamento e diagnóstico inadequado e as infecções estariam sendo subnotificadas. Este trabalho se propôs a investigar a prevalência de anticorpos IgG anti-hantavírus (infecção pregressa) na população alagoana, como indicativos da presença deste vírus no estado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve Histórico

Registros da medicina chinesa indicam a possível presença de hantavírus já em 960 a.C., que relatam a ocorrência de doença febril com presença de fenômenos hemorrágicos, provavelmente tratando-se de casos de hantavirose (HJELLE et al., 2010). Posteriormente, entre 1913 e 1930, cientistas soviéticos descreveram surtos esporádicos de febre com insuficiência renal no leste da União Soviética, sendo então, esta doença reconhecida como Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) (SCHMALJONH & HJELLE, 1997). No entanto, a enfermidade chamou a atenção do mundo ocidental, apenas em 1950, quando cerca de 3.000 soldados norte-americanos que serviam as forças das Nações Unidas na Coreia desenvolveram uma doença febril associado à hemorragia, choque e insuficiência renal e taxa de letalidade entre 5 e 10% (SMADEL, 1953).

Apesar da descoberta desta doença e de todos os estudos prévios, somente em 1976 o seu agente etiológico foi identificado, bem como, o seu roedor-reservatório. Assim, o termo hantavírus origina-se do nome do rio Han, onde o vírus *Hantaan* (HTNV) (agente etiológico) foi isolado pela primeira vez, pelo médico Lee Ho-Wang e colaboradores, dos pulmões de um camundongo silvestre *(Apodemus agrarius)*, capturado no vale (*taan*) deste rio, durante a Guerra da Coreia (LEE et al., 1978). Os hantavírus foram, então, incluídos na família *Bunyaviridae* como proposto ao Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) com a criação de um novo gênero (*Hantavirus*) devido às similaridades morfológicas e genéticas (LEDUC, et al., 1986; IVERSSON et al., 1996).

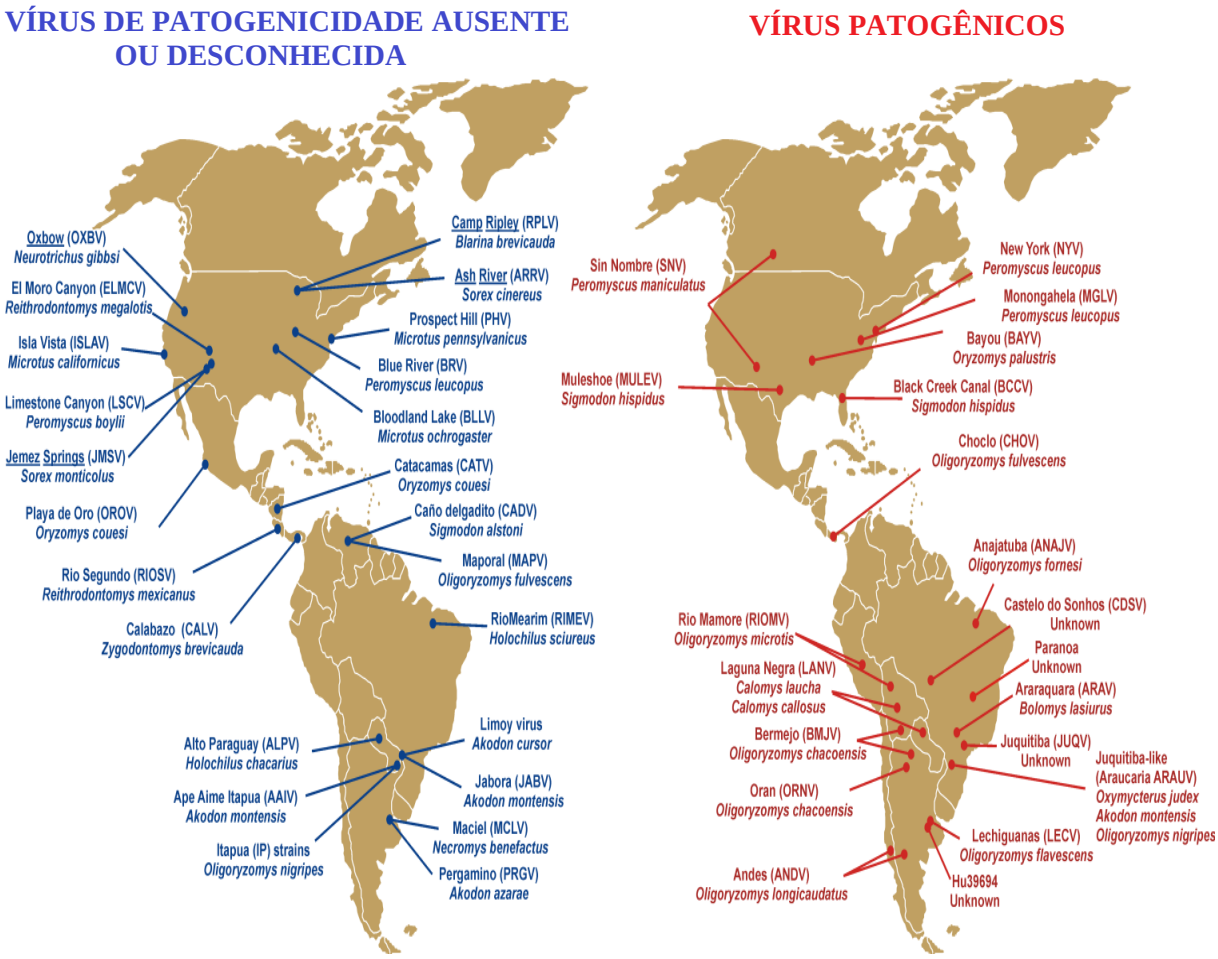
Nas Américas, a hantavirose foi reconhecida primeiramente em maio de 1993, na região de *Four Corners*, uma área do Sudoeste dos Estados Unidos da América (EUA) compartilhada pelos estados do Novo México, Arizona, Colorado e Utah, na qual índios navajos foram vitimados por uma doença pulmonar grave e morreram em um curto período de tempo (NICHOL et al., 1993). Por apresentar sintomas como febre, cefaleia, mialgia e calafrios foram confundidos com influenza; havendo uma rápida progressão com edema pulmonar, insuficiência respiratória com choque e morte após o início da doença em quase 50% dos acometidos (ZAKI et al., 1995; KHAN et al., 1996). Seis meses após a identificação

dos primeiros casos, o vírus responsável pela epidemia foi isolado de um roedor silvestre (*Peromyscus maniculatus*) e foi denominado, inicialmente, Four Corners, posteriormente, Muerto Canyon e, por último, *Sin Nombre* (HJELLE et al., 1994).

Nesse continente, a hantavirose se caracteriza por apresentar proeminentes sintomas respiratórios e comprometimento pulmonar sendo denominada por Síndrome Pulmonar por Hantavírus (SPH). No entanto, a partir dos primeiros casos detectados na América do Sul, foi observado importante extravasamento capilar e depressão miocárdica, passando a ser denominada Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavírus (SPCVH) (PINCELLI et al., 2003; BORGES & FIGUEIREDO, 2007).

No Brasil, os primeiros casos de hantavirose em seres humanos foram identificados em novembro de 1993 na cidade de Juquitiba, no interior de São Paulo, associados a uma nova espécie viral, o vírus Juquitiba. A doença foi caracterizada por febre, dor de cabeça, mialgia, prostração, tosse, vertigem, náusea e vômito (DA SILVA et al., 1997). Após a descoberta deste vírus, outros foram também identificados no Brasil: o vírus Araraquara, associado a casos de SPCVH no Sudeste brasileiro; no estado do Pará foi descrito outro hantavírus chamado Castelo dos Sonhos (JOHNSON et al.,1999), no estado do Maranhão duas variantes foram identificadas e designadas como Anajatuba e Rio Mearim (TRAVASSO DA ROSA et al., 2005), Laguna Negra no estado do Mato Grosso (RABONI et al., 2009), o vírus Paranoa no Distrito Federal (MELO-SILVA et al., 2009) e Jaborá em Santa Catarina (OLIVEIRA et al., 2011) (**Figura 1**). Apesar de ser uma doença de baixa incidência, acredita-se que o número de espécies de hantavírus ainda não seja totalmente conhecido, fazendo com que pesquisadores de diversas partes do mundo dediquem-se a esta busca/investigação, sendo provável que esta lista ainda aumente.

Figura 1- Distribuição dos hantavírus nas Américas segundo a patogenicidade.



Nota: Distribuição dos genótipos dos hantavírus patogênicos (vermelho) e de patogenicidade desconhecida ou reduzida (azul) para seres humanos. Hantavírus relatados na família Soricomorpha (musaranhos e toupeiras) estão sublinhadas.

Fonte: Adaptado de HJELLE et al., 2010.

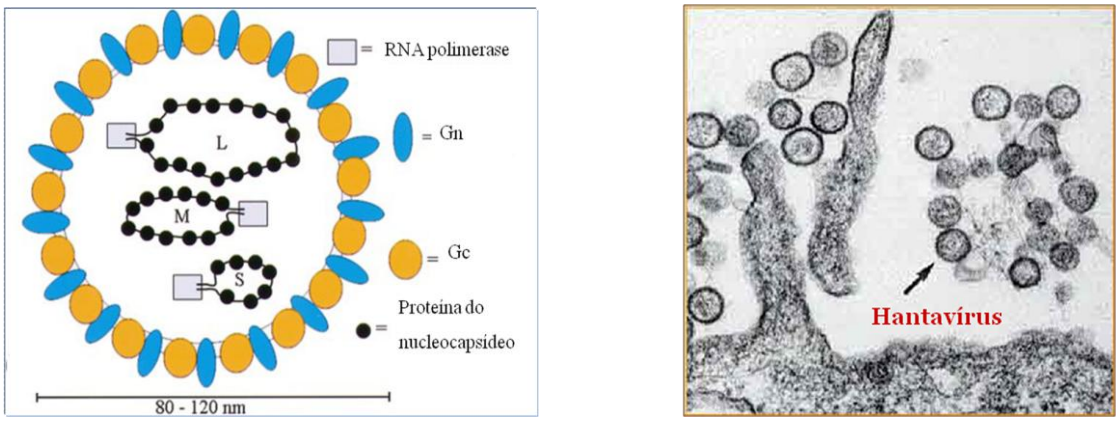
2.2 Hantavírus: taxonomia e estrutura viral

Os hantavírus pertencem à família *Bunyaviridae*. Esta abriga mais de 300 vírus sorologicamente distintos classificados em cinco gêneros: *Orthobunyavirus, Nairovirus, Phlebovirus* e *Hantavirus* responsáveis por infecções em vertebrados, e ainda um quinto gênero *Tospovirus* que se especializou em infectar vegetais (FIGUEIREDO, 1999).

Os representantes do gênero *Hantavirus* são esféricos e envelopados, medindo de 80 a 120 nm com projeções glicoproteicas na superfície viral, possuem como material genético RNA fita simples tri-segmentado (recoberto pela proteína N), sendo estes segmentos circulares, com polaridade negativa (RNAss [-]) associados a uma enzima de replicação viral (PLYUSNIN, 2001; JONSSON, 2010) (**Figura 2**).

Figura 2- Estrutura dos hantavírus.

A) B)



Nota: Representação esquemática da estrutura do hantavírus apresentando nucleocapsídeos e as glicoproteínas Gn e Gc inseridas no envelope viral (A). Imagem de microscopia eletrônica de hantavírus. Eletromicrografia de transmissão do vírus *Sin Nombre* (SNV) isolado de casos de HCPS no sudoeste dos Estados Unidos em 1993 (B).

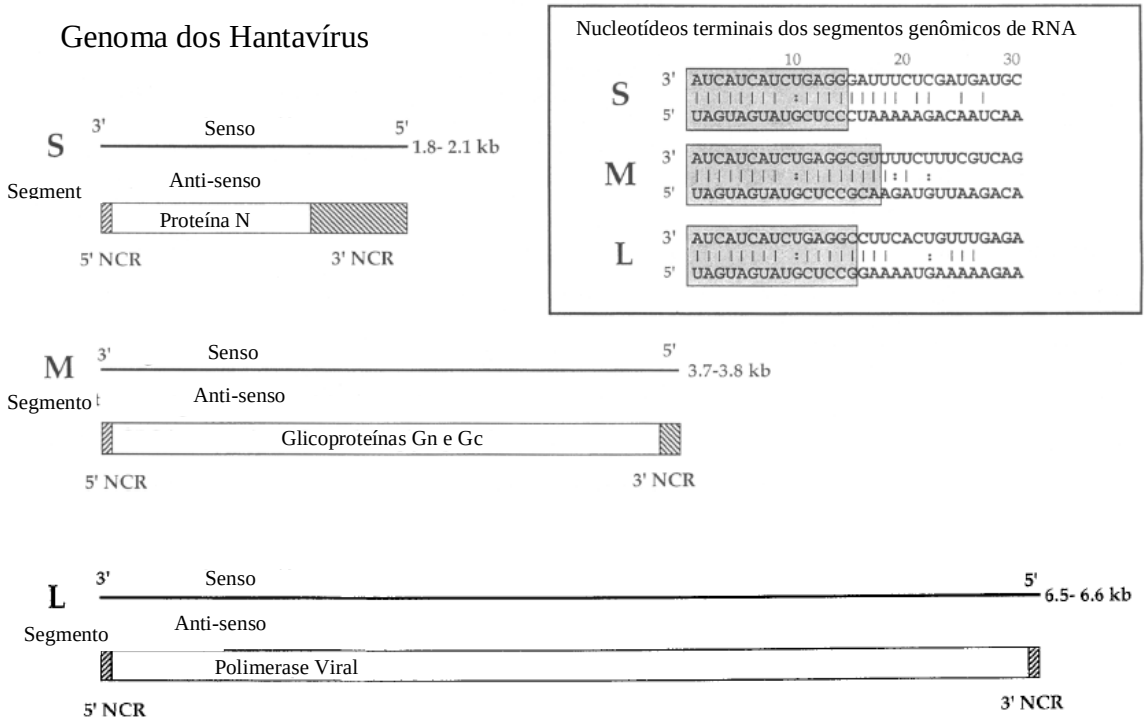
Fonte: A- Adaptado de LEDNICKY, 2003; B- *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC).

Os segmentos gênicos, que codificam três proteínas estruturais, são denominados grande (L), médio (M) e pequeno (S). O segmento L, com tamanho aproximado de 6.400 nucleotídeos, codifica uma proteína com atividade de RNA polimerase RNA-dependente (RdRp ou proteína L) (250kD). O segmento M, em média com 3.465 nucleotídeos, possui informações para a produção de uma glicoproteína precursora (GCP) que posteriormente é clivada em glicoproteínas Gn e Gc (anteriormente chamadas G1 e G2) que estão envolvidas com a adesão do vírus à célula. Estas glicoproteínas também permitiram identificar os receptores de células hospedeiras ao vírus e são alvo da neutralização por anticorpos. Finalmente, o segmento S, com 961 nucleotídeos, codifica a proteína do nucleocapsídeo viral,

a proteína N, que envolve o genoma viral (NICHOL et al., 1993; PLYUSNIN, 1996a; PLYUSNIN, 2001; JONSSON et al., 2010) (Figura 3).

Os RNAs genômicos dos hantavírus são complexados com a proteína N para formar nucleocapsídeos helicoidais, que devido à complementaridade entre as sequências terminais 5' e 3' de cada segmento genômico torna-se circular (**Figuras 2 e 3**). As extremidades dos segmentos de RNA servem como sítio de reconhecimento para a polimerase viral (ELLIOTT, 1997; FIGUEIREDO, 1999).

Figura 3- Representação esquemática dos segmentos genômicos dos hantavírus.



Fonte: Adaptado de PLYUSNIN et al., 1996a.

Outros gêneros pertencentes à família *Bunyaviridae*, como *Orthobunyavirus*, *Plebovirus* e *Tospovirus*, apresentam uma proteína não estrutural (NS) (ELLIOTT, 1997 e PLYUSNIN, 2001). No entanto, estudos sugerem a presença de NS em algumas espécies de hantavírus, uma vez que esta proteína já foi encontrada como funcional em células infectadas

por *Puumala* e *Tula* vírus, para a qual, especula-se que tenha função inibitória para o sistema imunológico do hospedeiro (VIRTANEN et al., 2010).

A proteína N é uma proteína não glicosilada com 428-433 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 50 KDa e é provável que seja o componente viral mais abundante tanto nos vírus quanto nas células infectadas (PLYUSNIN et al., 1996a; KAUKINEN et al., 2005). É uma proteína altamente imunogênica e conservada em seres humanos, o que a torna a primeira escolha como reagente em testes diagnósticos para detecção desta infecção viral (FIGUEIREDO et al., 2008; TISCHLER et al., 2003; FIGUEIREDO, 1999; ELLIOTT, 1997)**.** Plyusnin e colaboradores (2001) observaram maior diversidade na sequência GPC do que na sequência da proteína N: 11,7% *vs*. 4,4% e 6,1% *vs*. 3,0%, quando comparados os pares virais *Khabarovsk* - *Topografov* e *Saaremaa* - *Dobrava*, respectivamente.

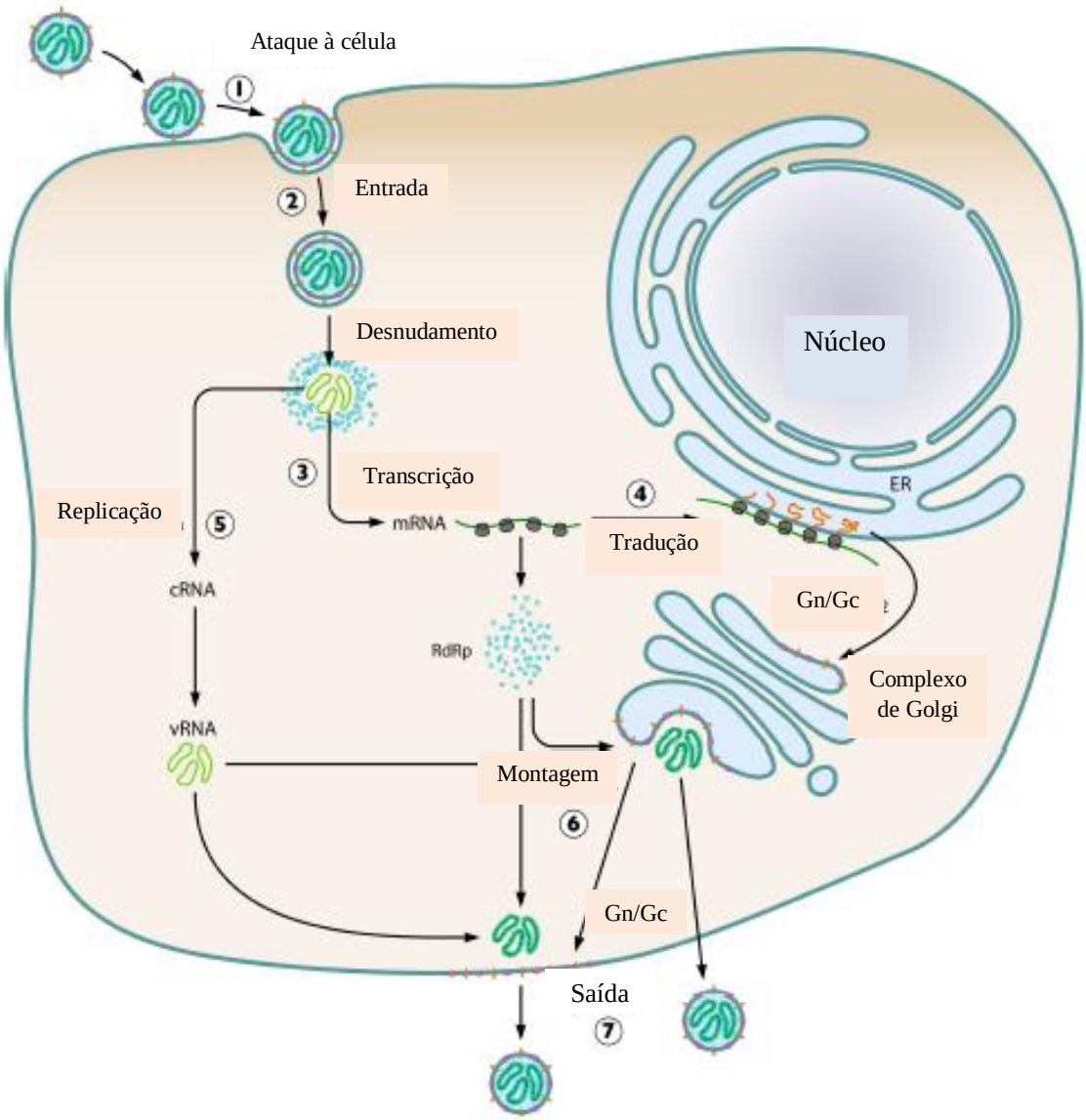
2.3 Replicação

A infecção inicia-se com a ligação do vírus à célula hospedeira por meio da interação entre as glicoproteínas do envelope viral, Gn e Gc, e proteínas de superfície celular, principalmente integrinas do tipo β. Os microrganismos penetram na célula através de endocitose (**Figura 4**) e fundem seus envelopes a membranas endossômicas, permitindo o acesso do nucleocapsídio viral ao citoplasma (FERREIRA, 2003) de forma dependente de pH (McCAUGHEY et al., 1999). Após acidificação, ocorre alteração conformacional das glicoproteínas de superfície (Gn e Gc), levando a fusão, com liberação dos nucleocapsídeos virais.

Os hantavírus infectam macrófagos, células dendríticas, plaquetas e células endoteliais (BORGES et al., 2006). Após inalação das partículas com vírus, este é fagocitado por células dendríticas ou macrófagos da mucosa de vias aéreas e alvéolos, que migram para os linfonodos regionais apresentando antígenos a células T e ativando-as (ZAKI et al., 1995; FIGUEIREDO, 2006; KRÜGER et al., 2011). Em ambos os tipos celulares, Gavrilovskya e colaboradores (1998, 1999) verificaram a presença de integrinas como importantes receptores envolvidos com a entrada do vírus na célula. Assim, hantavírus não patogênicos utilizam

receptores celulares integrinas $\alpha_v\beta_1$, enquanto que as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ estão relacionadas à entrada dos hantavírus patogênicos, agentes etiológicos da FHSR e SPCVH. Isto sugere que interações com integrinas específicas podem contribuir para a patogênese de hantaviroses.

Figura 4- Ciclo replicativo dos hantavírus.



Nota: Passos básicos que incluem a adesão da partícula viral à superfície celular através das interações entre as células dos hospedeiros e a glicoproteína viral (1), entrada mediada através da utilização de receptores por endocitose e desnudamento e liberação do genoma viral (2), transcrição de RNA (RNAm) a partir do genoma RNA viral (RNAv) (3), tradução dos RNAm dos segmentos L, M e S usando a maquinaria do hospedeiro (4), replicação do RNA viral associada à proteína N e transporte para o complexo de Golgi (5), montagem dos componentes virais no complexo de Golgi (6), e saída do vírus via fusão da vesícula de Golgi abrigando a partícula viral madura com a membrana plasmática (7).

Fonte: Adaptado de JONSSON et al., 2010.

O processo replicativo dos hantavírus ocorre exclusivamente no citoplasma da célula hospedeira (WANG et al., 2010). Assim, os nucleocapsídeos são introduzidos no citoplasma por fusão do vírus com a membrana endossomal (**Figura 4**). Inicialmente, utilizando a polimerase viral, ocorre a transcrição do RNA com polaridade negativa a RNA mensageiro ou complementar, que atua como molde de polaridade positiva utilizado na replicação do genoma viral. Este apresenta dupla função, sendo também utilizado no processo de transcrição dos genes virais.

A produção das proteínas que irão constituir parte dos novos vírus é iniciada com a associação da proteína L aos três nucleocapsídeos virais (L, M, S). Além da função de replicase, a proteína viral L também apresenta atividade endonuclease clivando o RNA mensageiro (RNAm) celular para a produção de iniciadores utilizados para começar a transcrição de mRNAs virais (KUKKONEN et al., 2005). Ribossomos livres realizam a tradução dos RNAm dos segmentos L e S, enquanto que o RNAm M é traduzido em ribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso, onde a glicoproteína é clivada e então transportada ao complexo de Golgi para glicolisação (WANG et al., 2010). Para os vírus do Velho Mundo a montagem ocorre no complexo de Golgi (**Figura 4**), enquanto que os hantavírus originários do Novo Mundo são montados junto à membrana plasmática da célula infectada. As partículas virais são liberadas por exocitose (SCHMALJOHN & HJELLE, 1997; FERREIRA, 2003; OGINO, 2004; JONSSON et al., 2010).

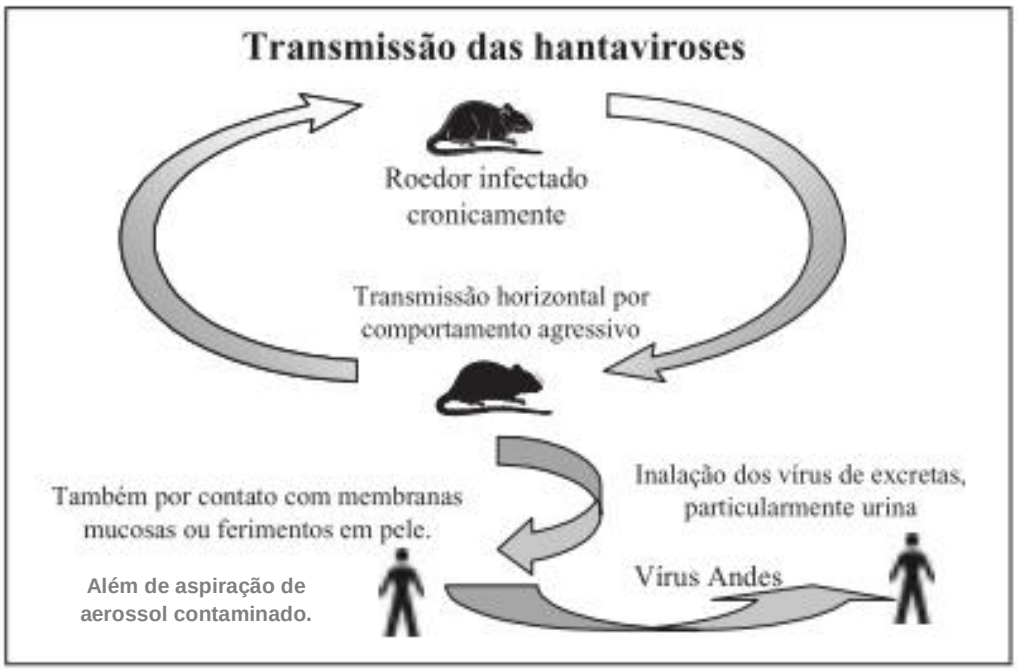
2.4 A Transmissão

Em geral, os vírus representantes da família *Bunyaviridae* são transmitidos por artrópodes (carrapatos ou mosquitos) e por isso são conhecidos genericamente como arbovírus. A hantavirose trata-se primariamente de uma zoonose de roedores, para a qual estes constituem reservatórios naturais (SCHMALJOHN & HJELLE, 1997; FIGUEIREDO, 1999; HEPOJOKI et al., 2012), podendo, o vírus ser detectado em órgãos como pulmões, baço, rins e glândulas parótidas e eliminado no ambiente por meio de seus excretas e saliva (FIGUEIREDO, 1999; DAUD et al., 2007; VAHERI et al., 2008; BAGAMIAN et al., 2012).

Entre os roedores, a transmissão horizontal (**Figura 5**) pode ser decorrente do comportamento agressivo, por vezes associado à busca por alimento, delimitação de território ou mesmo disputa por fêmeas, sendo demonstrada maior prevalência entre machos e em especial nos mais velhos (SCHMALJOHN & HJELLE, 1997; MEYER & SCHMALJOHN, 2000; JONSSON et al., 2010; MILLS et al., 2010; LIMA et al., 2011; LOUNG et al., 2011). Outra forma possível de infecção é por meio da aspiração de aerossóis, a exemplo das gotículas de urina geradas durante agressões (MEYER & SCHMALJOHN, 2000, HEYMAN et al., 2012). A transmissão vertical, da fêmea para o filhote, é desprezível ou ausente tanto em ambientes selvagens quanto experimentais, podendo os anticorpos maternos proteger a prole da infecção por hantavírus por alguns meses (SCHMALJOHN & HJELLE, 1997; TARUISHI et al., 2008; JONSSON et al., 2010; HEYMAN et al., 2012). Estudos demonstram que na primeira semana pós infecção (p.i.) já é possível detectar na corrente sanguínea de roedores (*Sigmodon hispidus)* hantavírus (*Black Creek Canal*-BCC), tendo sido, também, este, isolado da urina nos 70 primeiros dias p.i. e nas fezes durante os primeiros 150 dias p.i. (HUTCHINSON et al.,1998). O vírus *Maporal* (MPRLV) também foi isolado a partir de amostras de urina do roedor (hamsters sírios) ainda no nono dia p.i. e em secreção de orofaringe no sétimo dia da infecção (BAGAMIAN, et al, 2012).

Nos seres humanos, a infecção é puramente acidental, sendo, em geral, o hospedeiro final do vírus (HEPOJOKI et al., 2012). A transmissão ocorre via aspiração de aerossóis contendo partículas virais presentes nos excretas (fezes e urina) e/ou saliva de roedores infectados (GLASS et al., 1988; ELLIOT, 1997; SCHMALJOHN & HJELLE, 1997; WELLS, 1997; CHIORATTO et al., 2010). Outra forma menos comum é a mordedura de animais infectados (DOURNON et al., 1984; GLASS et al., 1988; HINSON et al., 2004) (**Figura 5**).

Figura 5- Modo de transmissão das Hantaviroses.



Fonte: Adaptado de PINCELLI et al., 2003.

A transmissão vertical na espécie humana, embora rara, já foi descrita na Coreia e França, onde, respectivamente, mães transmitiram a infecção para seus fetos, com consequente morte fetal e aborto (LEE, 1989) e grávida com FHSR teve um bebê com sinais de hantavirose sugerindo uma transmissão transplacentária do vírus (SCHNEIDER et al., 2009). No entanto, estes achados contrastam com os relatos de outros autores que verificaram a ausência de antígeno para hantavírus em autópsias fetais e placentárias originárias de mulheres infectadas (HOWARD et al., 1999; HOFMANN et al., 2012).

Entre seres humanos, a transmissão é pouco comum, porém possui ocorrência conhecida para o vírus *Andes* (ANDV) no Chile e Argentina. Durante surto causado pelo ANDV foi descrita a transmissão de pessoa para pessoa durante a fase prodrômica ou pouco depois desta (MARTINEZ et al., 2005). Acredita-se que pacientes transmitiram o vírus para médicos e funcionários do hospital por meio do contato direto com gotículas e aerossóis infectados. De forma semelhante, no Chile, após surto, três pessoas apresentaram quadro leve

de hantavirose e uma pessoa apresentou infecção aguda assintomática (WELLS et al., 1997; PADULA et al., 1998; TORO et al., 1998).

A maioria dos casos de doença humana associada a hantavírus resulta da exposição natural a roedores silvestres infectados. No entanto, registro de casos de FHSR por infecções acidentais na Coreia datam da década de 70, quando médicos e veterinário foram infectados por ratos capturados e mantidos em laboratório (UMENAI et al., 1979). O mesmo ocorreu no Japão, com cerca de 120 casos de infecção pelo vírus *Seoul*. Ainda, há registro de outros casos de infecção adquirida em laboratório por estudantes, funcionários e cientistas na Bélgica e Inglaterra (CDC, 1994; ZHANG et al., 2010).

Também é conhecido que o risco de infecção por hantavírus está relacionado com a densidade populacional de roedores, bem como com a probabilidade de contato destes animais infectados com populações humanas. Assim, a cadeia de transmissão é influenciada pelo contexto ambiental, ecológico e das relações do homem com o ambiente (DONALISIO et al., 2008). Pessoas de baixo nível econômico tornam-se as mais vulneráveis à infecção por hantavírus por possuírem piores condições de habitação e, em geral, estarem relacionadas a atividades agrícolas, o que favorece um contato mais próximo entre seres humanos e roedores possivelmente infectados. No entanto, a suburbanização, atividades de caráter profissional, camping e lazer ao ar livre têm contribuído para a disseminação da infecção a pessoas da renda média e alta (SCHMALJOHN & HJELLE; 1997; FREY, et al., 2003; FERREIRA, 2003). Um exemplo ocorreu em 2012, quando o Departamento de Saúde Pública da Califórnia anunciou casos confirmados de SPCVH em residentes que estiveram no Parque Nacional Yosemite, EUA, havendo óbitos (CDC, 2012). Já em locais fechados, a exposição é relacionada à invasão das casas pelos roedores campestres durante o tempo frio ou a nidificação de roedores em ou perto de habitações (SCHMALJOHN & HJELLE; 1997).

2.5 Os reservatórios

Os hantavírus têm como reservatórios roedores pertencentes às subfamílias Murinae, Arvicolinae e Sigmodontinae e parecem estar preferencialmente associados a determinadas espécies de roedores. Roedores das subfamílias Murinae e Arvicolinae destacam-se como

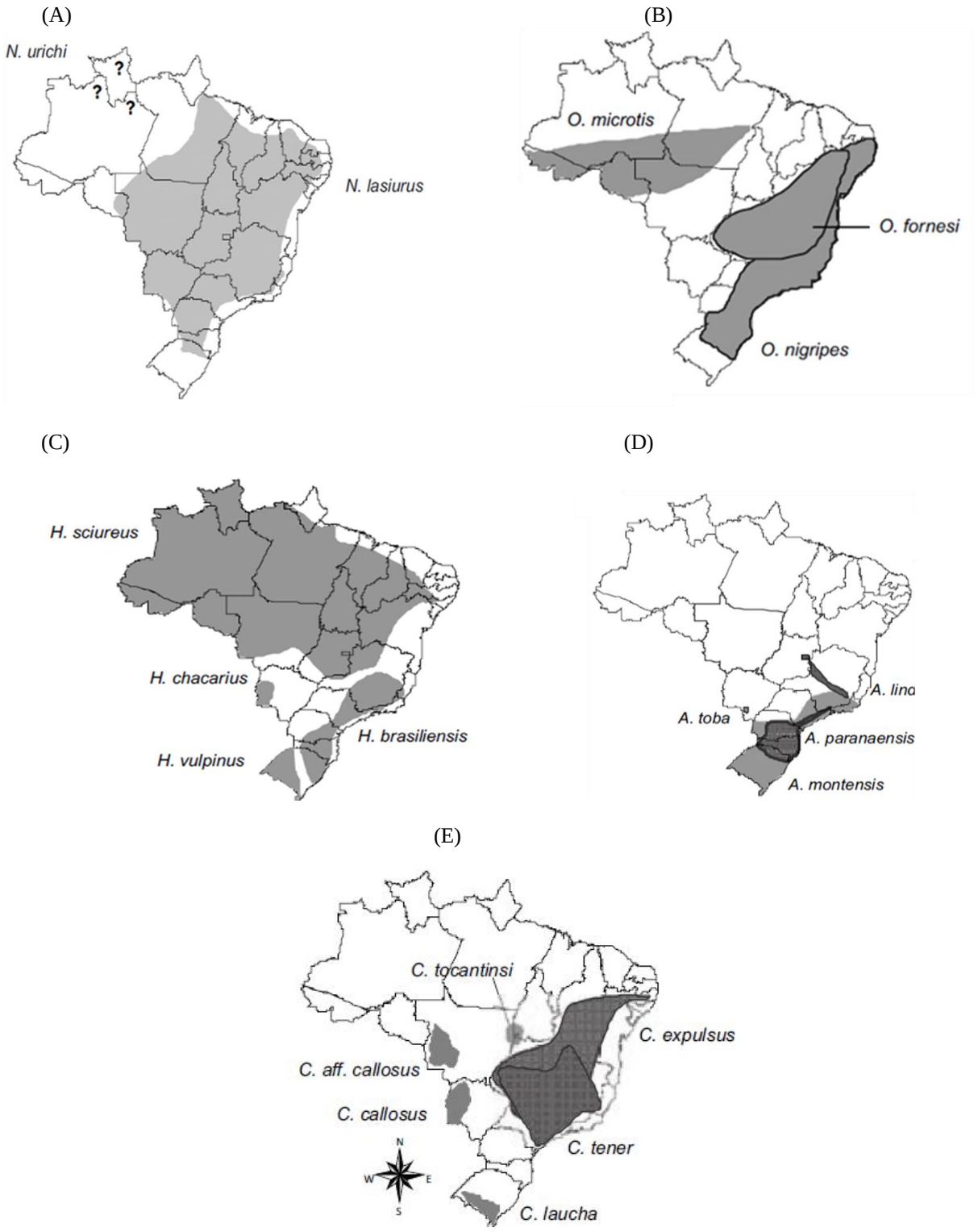
transmissores dos vírus no Velho Mundo, onde causam FHSR e membros da subfamília Sigmodontinae, trasmissores de hantavírus no novo mundo, estão associados à SPCVH (GLASS et al., 1988; ELLIOT, 1997; SCHMALJOHN & HJELLE; 1997; WELLS, 1997; PLYUSNIN, 2001; CHIORATTO et al., 2010).

A subfamília Sigmodontinae compreende roedores silvestres, diferentes daqueles conhecidos no ambiente urbano. No entanto, podem se aproximar do ambiente peridomiciliar, em áreas rurais, facilitando a transmissão da virose para os seres humanos (PINCELLI et al., 2003). O Brasil abriga cerca de 450 das 540 espécies dessa família distribuídas nos diferentes biomas, como Cerrado e Mata Atlântica (MILLS, 2006; JONSSON et al., 2010).

Dentre as espécies de roedores presentes no Brasil associadas à hantavirose, merecem destaque: *Oligoryzomys nigripes*, o ratinho do arroz (associado ao vírus *Juquitiba*) e *Necromys lasiurus* (antigo *Bolomys lasiurus*), o rato do rabo peludo (associado ao vírus *Araraquara*), como as mais importantes espécies reconhecidas como reservatórios de hantavírus (SUZUKI *et al.*, 2004), ambas de ocorrência em Alagoas (BONVINCINO *et al.*, 2008). Além destes, outros gêneros de roedores podem abrigar hantavírus: *Akodon montensis,* o rato-da-mata (vírus *Jaborá*) (FIGUEIREDO, 2006; JONSSON et al., 2010), *Holochilus sciureus*, o rato-da-cana (vírus *Rio Mearim*) (MARQUES, 1988; NUNES et al., 2011) e *Calomys tener,*o rato-do-campo (*Laguna Negra*) (FIGUEIREDO et al., 2010; JONSSON et al., 2010) (**Figura 6**) (**Tabela 1**). Devido a extensão continental do Brasil, é possível que outras espécies de roedores silvestres também, abriguem outros vírus com o potencial para causar hantavirose em seres humanos (FERREIRA, 2003).

Outros animais têm sido descritos como reservatórios de hantavírus (SCHMALJOHN & HJELLE, 1997), tais como: espécies de pequenos mamíferos, mussaranhos e toupeiras, servindo como hospedeiros acidentais (KANG, 2010) e ainda morcegos (ARAUJO et al., 2012; WEISS, 2012; GUO et al., 2013). Gatos, cães e coiotes podem ser infectados através de contato com roedores infectados e trazendo-os para perto dos seres humanos, todavia não há relato de transmissão para humanos. Os animais domésticos e carnívoros não parecem ter papel significativo na epidemiologia (MALECKI et al.,1998).

Figura 6- Mapa de distribuição dos roedores associados à hantavirose encontrados no Brasil.



Nota: Distribuição geográfica das espécies *Necromys lasiurus* em (A), *Oligoryzomys nigripes* em (B) e *Holochilus sciureus* (C) também encontradas no Estado de Alagoas; em (D) *Akodon montensis* e em (E) a distribuição da espécie *Calomys Tener*.

Fonte: adaptado de BONVINCINO et al., 2008.

Tabela 1- Espécies de roedores, subfamília *Sigmodontinae,* reservatórios de variantes de hantavírus no Brasil e sua distribuição geográfica*.

Espécie de roedor-reservatório	**Variante de hantavírus que abriga**	**Distribuição geográfica do roedor no Brasil***	**Locais/Estados de ocorrência de infecção por hantavírus**	**Referência**
Necromys lasiurus	Araraquara	Cerrado e Mata Atlântica, leste do Pará, MA, PI, CE, RN, PB, PE, AL, SE, BA, RJ, SP, PR, SC, MS, GO, TO, MG, norte do RG, sudoeste de RO,	Planalto central, Ribeirão Preto (SP)	SANTOS 2011b; FIGUEIREDO, 2010
Oligoryzomys nigripes	Juquitiba	Mata Atlântica, Cerrado, desde Pernambuco até norte do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Distrito Federal.	São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.	FERREIRA, 2003
Oligoryzomys aff. Moojeni	Castelo dos Sonhos	Sul do Tocantins, norte de Goiás, noroeste de Minas Gerais.	Município de Altamira, Estado do Pará (PA)	JOHNSON et al., 1999; MEDEIROS et al, 2010.
Calomys tener/ Calomys callosus/ Calomys callidus	*Laguna Negra*	São Paulo, Cerrado e Floresta Amazônica, Mato Grosso.	São Paulo e Mato Grosso	FIGUEIREDO et al., 2010; SUZUKI et al.; 2004; BRASIL, 2010; ROSA et al., 2012.
Oligoryzomys fornesi	Anajatuba	Distrito Federal, norte de Minas Gerais, Goiás, Bahia e oeste de Pernambuco.	Maranhão	MENDES, 2004, ROSA et al., 2005
Holochilus sciurus	Rio Mearim	AC, AM, RR, PA, RO, MT, GO, TO, MA, PI, sul do Amapá, oeste dos estados: PE, AL, BA, MG.	Maranhão	JOHNSON et al., 1999
Oligoryzomys microtis	*Rio Mamoré*	Acre, sul do Amazonas, Rondônia, sul do Pará, norte do Mato Grosso.	Amazonas	ROSA et al., 2005
Akodon montensis	Jaborá	do estado RJ ao RG, no leste de MG	Meio-oeste de Santa Catarina	OLIVEIRA et al., 2011.

*Distribuição de roedores segundo Bonvicino et al., Guia dos Roedores do Brasil, OPAS/OMS, 2008.

Fonte: adaptado de GOMES DE LIMA, 2012.

A distribuição do roedor-reservatório está relacionada a fatores climáticos e vegetação, o que reforça a necessidade de estudo em distintos biomas. Santos e colaboradores (2010) demonstraram que 80% dos casos de hantavirose que ocorreram no Distrito Federal (2003-2008) aconteceram em épocas de estiagem (abril-outubro), isto devido ao fato de que os roedores procuram alimento e abrigo em outras áreas, permitindo assim, o contato dos seres humanos com as excretas desses animais, aumentando as chances da infecção. Goodin e colaboradores (2009) verificaram a preferências do roedor *A. montensis* a áreas com pouco dossel e cobertura vegetal mais densa sobre e perto do chão, no Paraguai. Outro fator relatado é a ação antropogênica, como por exemplo, o desmatamento de áreas naturais de ocorrências de ratos, deslocando estes animais para outras regiões, favorecendo a invasão de áreas de ocupação de humana (DONALISIO et al, 2008).

Uma vez que os hantavírus estão relacionados aos seus reservatórios, a identificação destes constitui uma das formas para o delineamento de metodologias de controle, que, associadas a medidas educativas, devem auxiliar na vigilância de forma a evitar o contato com roedores ou suas excretas. São táticas de prevenção em áreas que apresentem sinais de roedores evitar ações que levantam poeira, descontaminar ambientes potencialmente infectados molhando-os com solução de hipoclorito diluídas a 10%, álcool 70%, solução com detergente, ou ainda, solução de fenol 10% e aguardar 30 minutos antes de proceder a limpeza (BRASIL, 2010). Para o vírus *Puumala*, Heyman e colaboradores (2012) relataram que os hantavírus continuam ativos fora do hospedeiro, permitindo transmissão indireta, sem contatos físicos com roedores infectados, permanecendo viáveis por 15 dias em gaiolas na ausência dos roedores infectados, em temperatura ambiente, e, provavelmente, muito mais tempo em ambientes frios e úmidos (KALLIO et al., 2006). Pressupõe-se ainda, que, em ambiente sob a ação da luz solar, o vírus sobreviva por até 6 horas; e que em ambientes fechados, na ausência de luz do sol e ação de ventos, o vírus possa permanecer ativo no ambiente por até 3 dias (BRASIL, 2010).

Tais ações resultam em uma redução na possibilidade de aspiração do vírus, mas também deve-se ressaltar a importância da redução de fontes de abrigo e alimentação de roedores, bem como, da preservação de animais predadores (cobras, gaviões, corujas, lagartos), que desempenham importante papel no controle da hantavirose, regulando o aumento populacional de roedores e sua invasão as residências (SCHMALJOHN & HJELLE 1997; DIVE, 2006; CAMPOS et al., 2009; BRASIL, 2010; LONDOÑO et al., 2011).

2.6 A infecção

Em roedores, a maioria das infecções por hantavírus ocorre de forma persistente e na ausência de sinais (PLYUSNIN et al., 1996; MORZUNOV et al., 1998), sendo o vírus eliminado continuamente nas excretas do animal e/ou saliva por toda vida (MORZUNOV et al., 1998; MEYER & SCHMALJOHN, 2000). Os mecanismos envolvidos na manutenção da infecção persistente por hantavírus em roedores são pouco conhecidos e vêm sendo recentemente estudados. Células Tregs parecem ter papel importante limitando a resposta imune inflamatória e, assim, contribuindo para a manutenção da infecção no roedor-reservatório (SHOUNTZ, 2007). Easterbrook e colaboradores (2007) demonstraram que a inativação funcional das células T reguladoras foi capaz de reduzir a quantidade de RNA do SEOV presente nos pulmões e a proporção de animais liberando o RNA viral na saliva. Todavia, estudos indicam que dois hantavírus presentes no continente americano podem causar danos em roedores-reservatórios, observando-se infiltrado imune na zona porta hepática e edema em septos alveolares nos pulmões em *Peromyscus leucopus* infectados pelo vírus *New York* (LYUBSKY, 1996) e em *Peromyscus maniculatus* infectado por *Sin Nombre* (NETSKI et al., 1999).

Os seres humanos, quando infectados, podem não apresentar sinais e sintomas aparentes, ou ainda, manifestar formas clínicas de infecção, desde a enfermidade subclínica, até casos graves de insuficiência renal, respiratória e óbito. No primeiro caso, o de infecção inaparente, a evidência da infecção só é obtida por meio da detecção de anticorpos específicos, indicadores do contato com o vírus, em inquéritos sorológicos. Nos casos de infecção aparente, a suspeita diagnóstica fundamenta-se nos antecedentes epidemiológicos (história de contato recente com roedor), podendo, assim, ser facilmente confundida com outras doenças, tais como leptospirose e dengue (IVERSON et al., 1994; SCHMALJOHN & HJELLE; 1997; BRASIL, 2010; GAMAGE et al., 2011; LIMA et al., 2011). Além disso, já foi demonstrado que a infecção por hantavírus induz *booster* de plamócitos de memória imunológica para outros patógenos, como por exemplo, o achado de que altos níveis de anticorpos IgM contra *Epstein-barr virus* e *Coxiella* estavam presentes em pacientes com infecção aguda por *Puumala* (WELLINGHAUSEN et al., 2012). Contudo, este mecanismo ainda não está elucidado. Todos esses aspectos dificultam o diagnóstico da hantavirose, ou na pior das hipóteses, podem até mesmo afastar tal doença como hipótese diagnóstica inicial,

principalmente em regiões onde a SPCVH é pouco conhecida. Para a detecção destes casos, os inquéritos sorológicos constituem-se como ferramenta importante (CAMPOS et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2000; LIMA et al., 2011).

Os inquéritos sorológicos são aplicados para a pesquisa de anticorpos, antígenos ou outros componentes do sangue de indivíduos de uma população aparentemente sadia. Estes têm ganhado destaque nas últimas décadas auxiliando no avanço do conhecimento sobre a ocorrência e distribuição de doenças infecciosas, a exemplo da hantavirose. Esta estratégia informa sobre a situação da afecção na coletividade, o que pode ser utilizado para orientar programas de saúde (PEREIRA, 1995). Nos inquéritos sorológicos para detecção de anticorpos anti-hantavírus, a proteína N é o antígeno utilizado, uma vez que este é o primeiro alvo de anticorpos em infecção humana aguda. Altos níveis de anticorpos específicos IgM contra proteína N podem ser detectados em cerca de 95% dos pacientes no momento da internação ou seis dias após o início da doença. Há, posteriormente, um declínio de IgM para níveis indetectáveis, enquanto que os níveis de IgG persistem e mantêm a imunidade contra infecções secundárias (HUJAKKA et al., 2003; KHAIBOULLINA et al., 2005; BORGES et al., 2006; KRÜGER et al., 2011).

Indivíduos acometidos por hantavirose podem, também, desenvolver quadros mais graves característicos, como a FHSR e SPCVH, nos quais o paciente pode evoluir a óbito (SCHMALJOHN & HJELLE; 1997; BRASIL, 2010). O desenvolvimento de uma das formas da hantavirose, FHSR ou SPCVH, depende do genótipo viral envolvido, bem como, da situação imunológica do indivíduo infectado (BORGES et al., 2006). Em ambas as síndromes, o quadro clínico inicia-se de modo semelhante a uma gripe, caracterizado por febre, mialgia, cefaleia, podendo ainda estar presentes dores abdominais, náuseas, vômitos e diarreia (KRÜGER et al., 2011) e lesão capilar que pode conduzir à hemorragia e choque em casos de FHSR ou edema pulmonar e asfixia em SPCVH (PLYUSNIN et al., 1996a). Apesar da dicotomia das formas clínicas, estudos recentes sugerem ruptura deste paradigma, podendo, em ambas, serem incluídos sintomas pulmonares e renais. Assim, pacientes com FHSR têm apresentado danos pulmonares e cardíacos, causados por hantavírus, característicos da SPCVH, e de forma semelhante, indivíduos acometidos por SPCVH podem apresentar sintomas renais (MAKELA et al., 2009; KRÜGER et al., 2011; RASMUSSO et al., 2011). Assim, alguns autores propõem que essas duas síndromes irão convergir futuramente (RASMUSSO et al., 2011; CLEMENT et al., 2012). No Brasil quase 20% dos casos de SPCVH registrados vêm acompanhados de insuficiência renal (ELKHOURY et al., 2012).

Deste modo, no contexto das várias formas clínicas da doença, surge a indagação sobre qual seria a forma predominante quanto ao quadro clínico para hantavirose (assintomática ou sintomática). Seria a maioria dos casos formados por infecções inaparentes, e apenas casos graves teriam como hipótese diagnóstica a hantavirose? Contudo, esta é uma questão de difícil resposta, uma vez que, de modo geral, apenas procura atendimento médico a parcela da população que desenvolve sintomas mais severos e/ou persistentes. Assim, Jonsson e colaboradores (2010) alegaram que, em áreas onde a infecção por hantavírus é bem conhecida, apenas os casos mais graves de hantavirose são diagnosticados, sendo estes a minoria. Dearing & Dizney (2010) indicaram que o número total de infecções por hantavírus em seres humanos é muito maior do que o número de internações e mortes, uma vez que muitas infecções não graves (brandas) não são relatadas (GROEN et al., 1994; BHARADWAJ et al., 2000; YE et al., 2004; KHAIBOULLINA et al., 2005; MURANY et al., 2005; VALDIVIESO et al., 2006).

2.7 Resposta imunológica

Ao contrário, do que acontece com os roedores nos quais a infecção, em geral, ocorre na ausência de sinais, nos seres humanos pode se desenvolver manifestações sintomáticas agudas (POUNDER et al, 2013), nas quais, o papel desempenhado pelo sistema imune pode contribuir para o desenvolvimento de um quadro clínico mais grave (BORGES et al., 2006).

Infecções por hantavírus resultam em forte indução de anticorpos e intensa resposta das células T (WOO et al, 2005). Após a infecção, células dendríticas (DC) infectadas migram para os nódulos linfáticos regionais onde induzem uma forte resposta imune direcionada contra a proteína N, principalmente, embora todas as proteínas estruturais (Gn, Gc, N) sirvam como fonte para epítopos. Assim, durante a infecção aguda, as células T respondem de forma vigorosa ao vírus envolvendo células T $CD8^+$ e gerando uma memória imunológica após a infecção. Estas células podem reconhecer os antígenos virais através de moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC-I) (BORGES et al., 2006).

Entretanto as células T, que são predominantemente citotóxicas, ao mesmo tempo em que eliminam os hantavírus causam dano tecidual, resultando em patogênese. Entre os elementos da resposta imune que estão envolvidos no desencadeamento da SPCVH e da FHSR estão a ativação exagerada de linfócitos T e a liberação de citocinas, como: o fator de

necrose tumoral, a interleucina 1, o interferon gama, o fator ativador de plaquetas e os leucotrienos. Essas substâncias ao aumentarem a permeabilidade vascular levam a transudação de líquidos para o espaço alveolar, desencadeando edema pulmonar e insuficiência respiratória aguda, indicando que a resposta imune mais acentuada é prejudicial e que a doença humana tem um componente imunopatogênico (LINDERHOLM et al, 1996; MORI et al, 1999; KILPATRICK et al, 2004; SAGGIORO et al, 2007; BORGES et al, 2008).

Nos roedores, as células T reguladoras desempenham papel na regulação da resposta imune em decorrência da produção de IL-10 e fator transformador de crescimento beta (TGF-β), importantes citocinas imunossupressoras. Sendo possível especular que estas podem também ocorrer em seres humanos e que, assim, indivíduos com maior atividade de células Tregs durante o desenvolvimento da doença possam apresentar formas mais amenas da infecção. Isto, devido ao fato do aumento da citocina TGF-β, importante na indução de células Treg e na supressão da resposta inflamatória, poder, talvez, prevenir a agressão imune (LIN et al, 2005; BORGES et al., 2008; CHEN et al, 2010). Um estudo realizado em pacientes com FHSR demonstrou a redução do número de células Tregs $FoxP3^+$ periféricas, quando comparado a indivíduos saudáveis. Nesta pesquisa, foi ainda, observada melhora acentuada no número de células Tregs $FoxP3^+$ em pacientes em fase de convalescença, sugerindo relação entre a redução das células Treg em circulação e a patogênese da FHSR. (ZHU et al, 2009).

Em relação à resposta humoral, apesar de o vírus estar no interior da célula do hospedeiro, a reposta de anticorpos é fundamental para eliminar a infecção viral dos espaços extracelulares, consistindo na produção de anticorpos específicos. Na fase aguda da infecção é possível detectar em 100% dos pacientes, o anticorpo IgM. Na convalescença há um declínio nos níveis de IgM e elevação nos níveis de anticorpos IgG, detectados por anos após a infecção. Os anticorpos fornecem uma barreira importante contra a propagação viral entre células e tecidos e são particularmente importantes na restrição da disseminação viral na corrente sanguínea, sendo amplamente utilizados no diagnóstico das síndromes (KRÜGER et al., 2011).

Dessa forma a gravidade da doença está associada ao aumento da permeabilidade vascular, à pneumonia intersticial com influxo de células mononucleadas, ao edema severo do tecido pulmonar e à trombocitopenia aguda (CARNEIRO & CARNEIRO, 2008).

2.8 Hantaviroses no Brasil

No Brasil, a SPCVH é um problema de saúde em decorrência da sobreposição de áreas urbanas e de agropecuária com ecossistemas que abrigam diferentes espécies de roedores-reservatórios de hantavírus (FIGUEIREDO, 2009). Assim, visando tratamento adequado e a tomada de medidas de controle no Brasil, casos em que o quadro clínico é compatível com os critérios de definição de caso de SPCVH, a notificação é compulsória e imediata, sendo classificada pelo Código Internacional de Doenças 2010 (CID 10) como B33.4 (BRASIL, 2010). O período de incubação varia de 9 a 33 dias, com média de 15 dias (FIGUEIREDO, 2006; CAMPOS et al, 2009). Entre o 2° e o 15° dias após o quadro inicial, o paciente desenvolve edema pulmonar não cardiogênico e hipotensão. Nessa fase ocorre progressiva infiltração de líquido e proteínas no interstício e alvéolos pulmonares, levando à hipoxemia grave, com necessidade de ventilação mecânica (PINCELLI, 2003). No Brasil, este tipo de hantavirose apresenta elevada mortalidade, 39,3% (ELKHOURY et al., 2012).

Em 1993, na cidade de Juquitiba-SP, ocorreram os primeiros registros brasileiros de hantavirose em seres humanos. Três irmãos, residentes em área desmatada, apresentaram quadro clínico compatível com a SPCVH, posteriormente confirmado por testes laboratoriais, sendo que dois morreram (DA SILVA et al., 1997). Em 1995 e 1996, mais quatro casos foram diagnosticados de hantavirose no Brasil. O primeiro ocorreu no estado do Pará (JOHNSON et al.,1999) e os demais casos ocorreram na (n=1) Bahia e em (n=2) São Paulo e desde então diversos casos foram registrados para as diferentes regiões do Brasil.

Na década de 90 ocorreram poucos registros de hantavirose no Brasil (**Tabela 2**), contudo estes apresentaram taxa alta de mortalidade (**Tabela 3**). Nestes casos a hantavirose, provavelmente, era confundida com outras doenças. Já nos anos subsequentes, com o avanço nas pesquisas científicas e a presença da hantavirose como hipótese diagnóstica houve um aumento no número de casos suspeitos e mudança na conduta médica frente aos pacientes acometidos pela síndrome. Assim, apesar do aumento no número de notificações houve redução na taxa de óbitos (**Gráfico 1**).

Tabela 2- Casos confirmados de Síndrome Pulmonar Cardiovascular por Hantavírus no Brasil de 1993 a 2013*.

Região e UF	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Região Norte	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	2	6	10	15	10	18	15	4	13	3	2
Rondônia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1
Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	2	0	0
Roraima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pará	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	2	2	9	15	9	17	15	4	11	3	1
Amapá	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tocantins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Nordeste	0	0	0	1	0	0	1	1	3	0	4	0	0	2	0	1	1	0	0	0	0
Maranhão	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	4	0	0	2	0	1	1	0	0	0	0
Piauí	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do No	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paraíba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pernambuco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sergipe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bahia	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Sudeste	3	0	0	2	0	7	13	10	13	29	38	49	50	43	45	35	34	47	30	20	0
Minas Gerais	0	0	0	0	0	2	3	9	5	14	21	39	39	34	25	19	24	24	11	9	0
Espírito Santo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio de Janeiro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
São Paulo	3	0	0	2	0	5	10	1	8	15	17	10	11	9	20	16	10	23	19	11	0
Região Sul	0	0	0	0	0	4	12	39	52	33	32	59	74	71	28	36	32	41	35	33	2
Paraná	0	0	0	0	0	0	7	24	30	15	14	10	48	10	6	10	10	14	10	9	1
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	1	5	16	11	16	41	23	50	18	17	12	19	16	18	1
Rio Grande do Su	0	0	0	0	0	4	4	10	6	7	2	8	3	11	4	9	10	8	9	6	0
Região Centro-Oe	0	0	0	0	0	0	3	3	10	12	7	45	32	59	42	35	48	73	21	22	0
Mato Grosso do S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Mato Grosso	0	0	0	0	0	0	3	2	10	12	5	9	11	49	29	22	26	48	8	14	0
Goiás	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	9	5	5	6	10	13	12	6	6	0
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	16	5	7	3	9	13	7	1	0
Indet/ Ignorada	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	4	0	1	7	3	4	8	18	15	1
Brasil	3	0	1	3	0	11	29	55	79	73	84	163	165	191	135	126	134	173	117	93	5

Fonte: Adaptado de SINAN/MS, 2013. *Dados preliminares, segundo UF de Infecção. Sugeitos a alterações.

Atualizado em 07/05/2013.

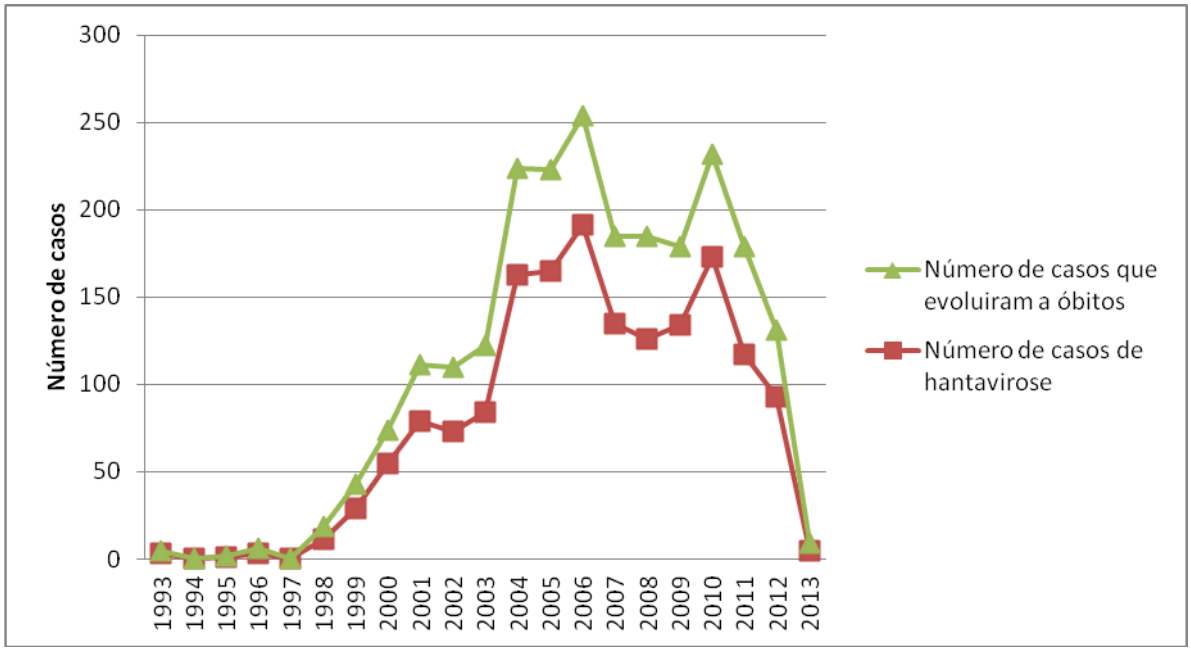
Tabela 3- Óbitos por Síndrome Pulmonar Cardiovascular por Hantavírus no Brasil de 1993 a 2013*.

Região e UF	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Região Norte	**0**	**0**	**1**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**0**	**0**	**0**	**0**	**3**	**7**	**4**	**10**	**4**	**2**	**11**	**1**	**1**
Rondônia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Roraima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pará	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	7	4	9	4	2	9	1	1
Amapá	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tocantins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Nordeste	**0**	**0**	**0**	**1**	**0**	**0**	**1**	**1**	**3**	**0**	**1**	**0**	**0**	**1**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Maranhão	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Piauí	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do N	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paraíba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pernambuco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sergipe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bahia	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Sudeste	**2**	**0**	**0**	**2**	**0**	**6**	**5**	**6**	**8**	**16**	**21**	**16**	**21**	**14**	**20**	**18**	**9**	**17**	**18**	**10**	**0**
Minas Gerais	0	0	0	0	0	1	1	5	3	8	11	10	16	9	12	10	5	8	5	4	0
Espírito Santo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio de Janeiro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
São Paulo	2	0	0	2	0	5	4	1	5	8	10	6	5	5	8	8	4	9	13	6	0
Região Sul	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**2**	**5**	**9**	**17**	**17**	**12**	**19**	**23**	**20**	**8**	**10**	**10**	**10**	**14**	**12**	**2**
Paraná	0	0	0	0	0	0	4	5	12	6	6	5	13	3	1	3	4	3	3	6	1
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	4	12	8	10	4	3	6	6	7	6	1
Rio Grande do Su	0	0	0	0	0	2	1	4	4	6	2	2	2	7	3	4		1	4	0	0
Região Centro-O	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**3**	**2**	**4**	**4**	**3**	**23**	**11**	**21**	**14**	**18**	**22**	**28**	**9**	**9**	**0**
Mato Grosso do S	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Mato Grosso	0	0	0	0	0	0	3	1	4	4	2	6	4	20	12	14	10	10	3	4	0
Goiás	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	6	2	1	1	3	7	8	4	4	0
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	5	0	1	1	5	10	2	0	0
Indet/Ignorada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3			4	3	0	2	10	6	1
Brasil	**2**	**0**	**1**	**3**	**0**	**8**	**14**	**19**	**32**	**37**	**38**	**61**	**58**	**63**	**50**	**59**	**45**	**59**	**62**	**38**	**4**

Fonte: Adaptado de SINAN/MS, 2013. *Dados preliminares, segundo UF de Infecção. Sugeitos a alterações.

Atualizado em 07/05/2013.

Gráfico 1- Número de casos notificados de SPCVH no Brasil de 1993 a 2013.

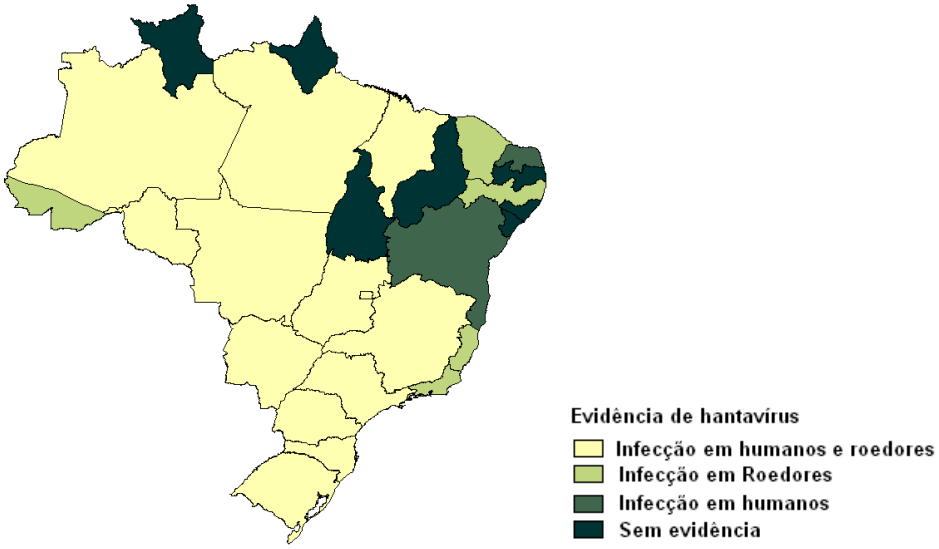


Nota: Dados do SINAN/MS. Atualizado em 25/05/2013.
Fonte: Autora, 2013.

Após os registros nos estados de São Paulo, Pará e Bahia, outros estados também diagnosticaram a síndrome, atualmente perfazendo um total de 14 das 26 unidades da federação e mais o Distrito Federal. Minas Gerais e Rio Grande do Sul notificaram os primeiros casos em 1998, enquanto que Rio Grande do Norte, Paraná, Mato Grosso e Santa Catarina registraram em 1999, seguido do Maranhão e Goiás em 2000, e Rondônia, Amazonas e Distrito Federal em 2004 (**Tabela 2**) (SINAN/SVS/MS, 2012). Contudo, já foi demonstrada evidências da infecção viral em roedores em outros estados, para os quais a presença da doença em seres humanos não foi notificada, como o Rio de Janeiro e Ceará (OLIVEIRA et al., 2009; CHIORATO et al., 2010) (**Figura 6**).

Segundo a SVS/MS (2013), entre 1993 e 2013 foram notificados 1.640 casos de infecção humana no Brasil, causando 653 óbitos. Apesar dos relatos em todas as regiões brasileiras, há um predomínio dos casos na Região Sul (583), Sudeste (468) e Centro-oeste (412) do país, correspondendo a 89,21% dos casos. A região Norte registrou 101 casos e a Nordeste apenas 14, podendo estes valores estarem associados à ausência de notificação ou mesmo estarem associados a circulação de espécie de patogenicidade reduzida, uma vez que apenas procuram atendimento médico os indivíduos que desenvolvem sintomas (**Tabela 2**).

Figura 6- Evidência de hantavírus no Brasil.



Fonte: Vigilância epidemiológica, Ministério da Saúde (2010).
Nota: Figura gentilmente doada por Marília Lavocat Nunes, Área Técnica de Hantaviroses, COVEV/CGDT/DEVEP/SVS/Ministério da Saúde, em 2010.

Os casos suspeitos devem ser encaminhados a hospitais que possuam unidade de terapia intensiva, devendo-se no transporte manter as condições hemodinâmicas e os parâmetros ventilatórios. Recomenda-se o isolamento do paciente em condições de proteção com barreiras (avental, luvas e máscara dotadas de filtros N_{95}) (BRASIL, 2010). O paciente pode evoluir a óbito em até 72 horas (DIVE, 2006). Não há relatos de casos de reinfecção por hantavírus, assim como não há tratamento específico para a hantavirose, sendo empregadas medidas de suporte para a manutenção das funções vitais, com ênfase na oxigenação.

2.8.1 Diagnóstico da SPCVH no Brasil

O diagnóstico da hantavirose é realizado a partir dos dados clínicos, histórico de exposição e testes sorológicos, por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA), com detecção de anticorpos IgM e IgG contra antígenos virais (BRASIL, 2010). Inicialmente, utilizavam-se, nesses testes, antígenos dos hantavírus *Sin Nombre* (EUA) (FELDMAN et al., 1993) ou *Andes* (Argentina) (PADULA et al., 2000), os quais eram produzidos por purificação direta do material viral após inativação. Atualmente, preferencialmente são utilizadas proteínas recombinantes produzidas por clonagem gênica, como a proteína N. Um dos grupos de pesquisa que expressaram proteína viral com a finalidade de uso diagnóstico foi o de Figueiredo e colaboradores (2008) que expressaram em *Escherichia coli* a proteína N do hantavírus Araraquara, a partir do sangue de paciente com SPCVH e, assim, esta também se

tornou uma opção de antígeno a ser utilizado nos testes sorológicos (JONSSON et al, 2010; FIGUEIREDO et al, 2011; LIMA et al, 2011; SOUZA et al, 2011; BADRA et al, 2012; GIMAQUÉ et al, 2012; MORELI et al, 2012; PEREIRA et al, 2012; GUSMÁN et al, 2013). A eficiência desta proteína recombinante como antígeno foi demonstrada em teste imunoenzimático para o diagnóstico de hantavirose em amostras clínicas de pacientes com SPCVH, provenientes da Argentina, apresentando sensibilidade de 97,2% e 100% de especificidade (FIGUEIREDO et al., 2009). Assim, demonstrou-se que o uso dessa proteína é adequado para fins de diagnóstico de infecção por hantavírus, aguda ou pregressa.

No Brasil, os laboratórios de referência para o diagnóstico de SPCVH são o Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) (IAL/SES/SP), Laboratório de Arbovírus e Hantavírus do Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS) (Belém do Pará) e Laboratório de Hantavirose e Riquetsiose da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (Rio de Janeiro). Estes utilizam o kit comercial Hantec®, produzido a partir de estudos realizados pelo grupo de Raboni e colaboradores (2007). Outra metodologia utilizada é a técnica de RT-PCR, amplificando os genes das proteínas Gn e N, diretamente do sangue ou fragmento de tecido de paciente ou roedor (CAMPOS et al., 2009; ARAUJO, 2010). O método imunohistoquímico também pode ser empregado para o diagnóstico *post mortem* (CAMPOS et al., 2009).

2.9 Hantavirose na Região Nordeste

Apesar do número expressivo de casos de SPCVH confirmados no Brasil, poucos foram identificados no Nordeste. Esta é a região com o menor número de notificações para hantavirose (**Tabela 2**), apenas 0,85% (nº de casos no NE/ nº total no BR) do total de casos brasileiros.

Nesta região, os primeiros indícios da circulação de hantavírus datam da década de 80, em estudo no qual Leduc e colaboradores (1985) evidenciaram a presença de anticorpos contra o vírus *Hantaan* em soros de ratos urbanos em Recife-PE. Contudo, somente em 1996, no estado da Bahia, ocorreu o primeiro registro oficial da doença na Região Nordeste, e logo após este, notificações foram feitas no estado do Rio Grande do Norte em 1999 e 2001. Todos os demais registros para esta região ocorreram no estado do Maranhão (11 casos). Neste estado, o primeiro caso ocorreu no ano de 2000 (MENDES et al., 2001) e a partir de então,

inquéritos sorológicos foram realizados, ampliando o conhecimento sobre a circulação de hantavírus no Nordeste.

Deste modo, dos nove estados que compõe a região Nordeste o Maranhão, Rio Grande do Norte e Bahia possuem registro de casos confirmados de SPCVH, apresentando taxa de letalidade superior a nacional (57,14%); os demais estados desta região são considerados indenes para hantavirose (BRASIL, 2010). O estudo/registro em áreas sem notificação de casos da SPCVH é escasso e isto se deve, ao menos em parte, ao fato de que a maioria destes é desenvolvida em locais onde já aconteceram casos de hantavirose (CHIORRATO et al., 2010). No Nordeste do Brasil, a SPCVH é desconhecida não apenas por grande parte da população, mas também por parte dos profissionais da área da saúde.

A presença de anticorpos anti-hantavírus em roedores já foi demonstrada em outros estados desta região. Contudo, a detecção de anticorpos nestes animais não constitui prova da circulação do vírus no local no momento da captura, demonstrando apenas que houve contato dos roedores com o vírus. Apesar disso, serve como forte evidência da presença do vírus na região, como por exemplo, o que ocorreu no estado do Ceará, onde num estudo prévio foi demonstrada a presença de anticorpos nos roedores e, no ano seguinte, encontrou-se também anticopos IgM em amostras de soro de pacientes com suspeita de dengue (CHIORRATO et al., 2010; LIMA et al., 2011).

No estado de Pernambuco, contrastando com o estudo de Leduc (1985), que na década de 80 identificou a presença de anticorpos anti-hantavírus em roedores, Sobreira e colaboradores (2008) não observaram a presença de anticorpos IgG contra a proteína N recombinante do hantavírus Araraquara (rN ARAV), utilizado o método de ELISA, em nenhuma das 218 amostras oriundas de roedores capturados durante a rotina do Programa de Peste em Recife-PE.

Nos estados de Alagoas, Paraíba, Piauí e Sergipe, até o presente, não há registro de infecção aguda por hantavírus, tanto em roedores quanto em seres humanos, sendo considerados pelo Ministério da Saúde como áreas silenciosas. Entretanto, estudos recentes em Alagoas demonstraram a presença de anticorpos IgG anti-hantavírus em soro de pacientes com leptospirose e em um paciente internado em hospital da capital, com quadro de doença pulmonar. Esses achados foram considerados pelos autores como sendo as primeiras evidências da circulação de hantavírus no estado (SANTOS-JÚNIOR, 2012). Desse modo, a doença pode estar presente em Alagoas, assim como em outros estados da região Nordeste e, devido a sua raridade e falta de suspeita clínica, ainda não foram identificados.

2.9.1 As mesorregiões de Alagoas

O estado de Alagoas, de acordo com a divisão das regiões naturais (na sequência litoral-interior), é composto pelas mesorregiões: Litoral, Agreste e Sertão, que apesar de não possuírem notificações para hantavirose apresentam condições ambientais favoráveis à ocorrência de casos de infecção por hantavírus, como descrito a seguir.

A vegetação litorânea apresenta regiões estuarinas e lagunares (CORREIA & SOVIERZOSKI, 2005), originalmente cobertas com floresta ombrófila densa, vegetação de grande porte (20-30 m), compõe a Mesorregião do Leste. No entanto, nesta mesorregião a vegetação original foi praticamente extinta em Alagoas pelo desmatamento desde a época colonial com o comércio de pau-brasil, implantação de engenhos de açúcar e áreas destinadas à agricultura. Esta foi, então, substituída pela monocultura canavieira, que se estende pelos tabuleiros, sob domínio do clima litorâneo (FERREIRA, 1999; SMARH, 2013). Nesta mesorregião são observados os maiores valores de precipitações anuais em torno de 1.500 mm. A estação chuvosa se estende de abril a agosto, enquanto o período seco se concentra nos meses de outubro a fevereiro. O sistema hidrográfico é formado por rios perenes, destacando a presença dos sitesmas lagunares, bastante característicos do litoral alagoano (SMARH, 2013). Neste *habitat* vivem em contínua proliferação diversos animais, incluindo roedores. A espécie *Oligoryzomys nigripes*, um dos principais reservatórios de hantavírus no Brasil, é encontrada em áreas de Mata Atlântica (SUZUKI et al., 2004), do estado de Pernambuco ao norte do Rio Grande do Sul, atravessando o estado de Alagoas. Outra espécie de roedor sigmodontineo reconhecidamente presente no estado é o *Akodon cursor* (BONVICINO et al., 2008). É possível, pois, que esses animais possam abrigar hantavírus também em território alagoano.

O bioma caatinga, termo de origem indígena que significa “mata clara e aberta”, é exclusivamente brasileiro e ocupa cerca de 11% do país, podendo em Alagoas ser encontrado na região oeste do estado, na Mesorregião do Sertão. Esta apresenta baixa umidade nos solos e no ar e vegetações de pequeno porte – cajueiros, umbuzeiros e juazeiros que costumam perder, quase que totalmente, as folhas em época de seca (ELETROBRÁS, 2008). A Mesorregião do Sertão é caracterizada pelo clima semiárido e caatinga como vegetação predominante. A precipitações anuais é em torno dos 700 mm, e o relevo se distingue pela presença de pediplano bastante regular. As chuvas são bastante concentradas nos meses de maio a julho, enquanto o período de novembro a janeiro é extremamente seco, o que

condiciona a existência de rios intermitentes (SMARH, 2013). Nesta mesorregião, o desmatamento e o "pisoteio" do gado contribuiram para compactação e ressecamento dos solos. Relatos na literatura apontam para a influência do clima na ocorrência de casos de hantavirose, a exemplo do estado de São Paulo, onde se evidencia que a maioria dos casos de SPCVH ocorre no início da estação seca (entre abril e julho) (PINCELLI et al., 2003). Na região Sul do Brasil ocorreram casos relacionados à atividade madeireira em áreas de reflorestamento de *Pinus sp*, ao plantio de milho e associados ao fenômeno da ratada (grande proliferação de roedores ocasionada pelo aumento na oferta de alimento decorrente da floração da taquara) (BRASIL, 2005; FIGUEIREDO, 2006; CDC, 2012). De forma semelhante, nos EUA, o surgimento dos primeiros casos, em 1993, foi associado a alterações climáticas resultantes de oscilações do fenômeno *El Niño* no sudeste árido deste país. Isto proporcionou aumento da precipitação e temperatura, com decorrente elevação da oferta de alimentos para os roedores e aumento na população desses animais. E ainda nos EUA, em 1997, o aumento de chuvas e consequente crescimento da vegetação precedeu a elevação no número de casos de hantavirose em 1998 (MILLS, 2005; DEARING & DIZNEY, 2010). É possível, então, especular que as características da Mesorregião do Sertão associadas à presença de roedores *Holochilus sciurus* e *Necromys lasiurus* (BONVICINO et al., 2008) favoreçam a circulação de hantavírus no estado de Alagoas.

Já na porção central do estado, Mesorregião do Agreste, há uma mescla de características das Mesorregiões do Leste e do Sertão (a exemplo das bacias úmidas do litoral e as regiões secas da parte do oeste do estado), sendo assim identificada como região de transição. A vegetação apresenta espécies arbóreas e arbustivas, onde se encontram algumas espécies da Mata Atlântica e da Caatinga. O clima pode variar de quente e seco a quente e úmido (COSTA, 2006). Nesta região, as precipitações se situam na faixa dos 1.000 mm anuais, com período chuvoso concentrado nos meses de abril a agosto, e o período seco nos meses de setembro a março. Nesta messoregião, verifica-se a existência de rios perenes e intermitentes, condicionados pelas situações fisiográfica e climatológicas locais (SMARH, 2013). Esta região apresenta como uma das principais culturas agrícolas o milho, já referido por Santos e colaboradores (2011b), no Distrito Federal, como associado ao surgimento de condições propícias ao aumento da população de roedores, pois a plantação de milho funciona como fonte de alimento para as espécies generalistas. Na América do Sul, onde as espécies de roedor-reservatório para hantavírus tendem a ser generalistas, a exposição humana à infecção por hantavírus é muitas vezes associada com práticas agrícolas (DEARING & DIZNEY, 2010). No Brasil, *Oligoryzomys* sp. e *Akodon* sp., demonstraram preferência por milho e

larvas, quando capturados e colocados em gaiolas, independentemente de sexo e idade (BRAGA, 2011). Estas espécies estão associadas à transmissão de hantavirose no Brasil, sendo a última (*Oligoryzomys* sp.) encontrada em Alagoas.

Desse modo, em virtude das características acima descritas e da associação destas aos casos já descritos de hantavirose, este trabalho teve por objetivo realizar uma busca mais ampla por evidências de infecções pregressas por hantavírus em populações das mesorregiões Leste, Agreste e Sertão do estado de Alagoas.

3 JUSTIFICATIVA

A hantavirose é uma zoonose de roedores e, nos últimos 20 anos, tornou-se um problema emergente de saúde pública nas Américas e, em especial, no Brasil. A infecção causa uma síndrome cardiopulmonar para a qual numerosas e crescentes notificações são registradas, apresentando taxa de letalidade em torno de 40%.

A síndrome está estreitamente relacionada a alterações ambientais, como desmatamento, agricultura, armazenamento de produtos agropecuários, substituição da mata nativa e situações que levem à proliferação de roedores. Assim, desequilíbrios ambientais reduzem ou eliminam espécies predadoras naturais destes animais, aumentando a exposição dos seres humanos e promovem consequente aumento no risco de infecção por hantavírus.

O estado de Alagoas historicamente é marcado por momentos de degradação ambiental, a exemplo da destruição da Mata Atlântica, o que propicia a transmissão da hantavirose. Somado a isto, já foram identificados na fauna do estado à presença de três das espécies reconhecidas como reservatórios de hantavírus no Brasil, *Oligoryzomys nigripes*, *Holochilus sciurus* e *Necromys lasiurus*. Porém, até o momento, segundo o Ministério da Saúde, não há caso de SPCVH registrado em Alagoas.

Deste modo, este trabalho se propôs a levantar evidências sorológicas da ocorrência de infecções pregressas por hantavírus em indivíduos saudáveis em diferentes mesorregiões do estado de Alagoas, por meio da realização de inquéritos sorológicos. Estas apresentam diferentes características associadas aos casos de hantavirose no Brasil, tais como cultivo agrícola, cana-de-açúcar e milho, e clima seco.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar a prevalência de anticorpos de memória IgG anti-hantavírus na população de municípios pertencentes às diferentes mesorregiões do estado de Alagoas.

4.2 Objetivos Específicos

- Realizar coleta de sangue e de dados epidemiológicos de indivíduos dos municípios de Coruripe, Palmeira dos Índios e Olho D'Água do Casado.
- Investigar a presença de anticorpos IgG anti-hantavírus por meio da técnica imunoenzimática (ELISA) nas amostras séricas coletadas.
- Analisar os dados epidemiológicos dos participantes do estudo, em relação ao seu histórico de doenças e de contato com roedores e suas atividades laborais.
- Relacionar os dados epidemiológicos com os títulos de anticorpos encontrados nos indivíduos sororreagentes.

5 METODOLOGIA

5.1 Aspectos éticos

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, sob protocolo nº 23065.009350/2010-62.

5.2 Áreas de estudo

Apesar da pequena extensão territorial (27.778,506 Km^2), no Estado de Alagoas, existem áreas com características diferentes nos aspectos físico, econômico, social e cultural. Assim, de acordo com as semelhanças e diferenças, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) dividiu o território alagoano em três mesorregiões: Sertão, Agreste e Leste Alagoano, que englobam onze regiões menores, denominadas microrregiões.

As coletas foram realizadas em um município de cada uma das mesorregiões, nas seguintes localidades: Usina Coruripe, em Coruripe (Mesorregião do Leste; Microrregião de São Miguel dos Campos, no litoral sul alagoano); comunidades rurais do município de Palmeira dos Índios (Mesorregião do Agreste; Microrregião de Palmeira dos Índios, ao norte do estado de Alagoas) e comunidades rurais do município de Olho D'Água do Casado (Mesorregião do Sertão; Microrregião Alagoana do Sertão do São Francisco, no oeste do estado e no Sertão alagoano) (**FIGURA 7**).

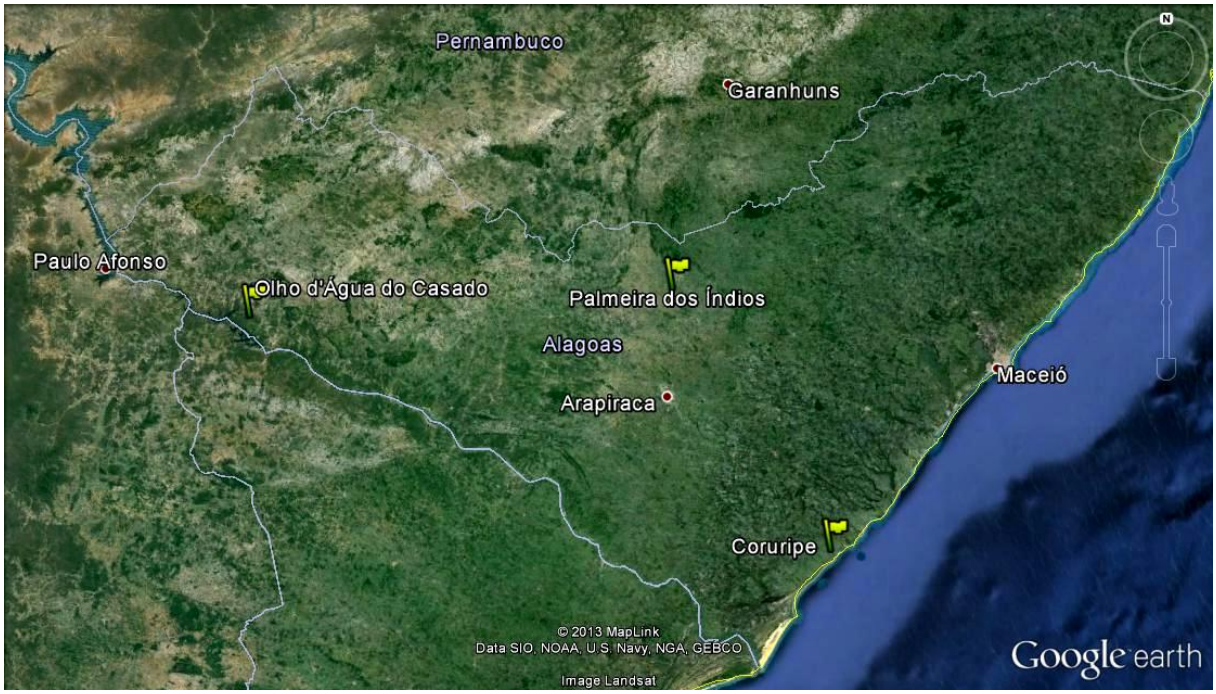
De forma sucinta, a Mesorregião do Leste é a mais populosa e apresenta clima quente e chuvoso, tendo como principais produtos a cana-de-açúcar, feijão, milho, mandioca e frutas variadas, além da produção de arroz nas terras alagadas do rio São Francisco. A Mesorregião do Agreste é marcada pelo predomínio de pequenas e médias propriedades, é uma região de transição com chuvas de inverno e verões muito secos, destacando-se a produção de fumo e milho. No Sertão alagoano, Mesorregião do Sertão, as chuvas são escassas e mal distribuídas, sendo, portanto, a mais afetada pela estiagem e seca (MENDES JÚNIOR, 2002).

Figura 7- Mapa de Alagoas (A) com indicação das mesorregiões e localização dos municípios onde foram realizadas as coletas para os inquéritos sorológicos para hantavírus (destacados com preenchimento em preto) e imagem de satélite demonstrando as diferenças na vegetação do estado (B).

A)

Fonte: Autora, 2013.

B)



Fonte: Google Earth, 2013.

5.2.1 Município de Coruripe

A pesquisa de anticorpos IgG contra hantavírus teve início com trabalhadores rurais da Usina Coruripe, localizada no município de Coruripe (10°33’10.20’’S e 36°38’56.29’’O). A usina foi fundada em 1925, tendo como atividades a produção de açúcar, álcool e energia, sendo a maior indústria produtora de açúcar e álcool do Norte-Nordeste. Tem aproximadamente 1.000 trabalhadores regulares, que desenvolvem atividades de contato direto com o campo, mesmo no período de entressafra, de abril a setembro. O município está situado na Mesorregião do Leste e na 13ª Microrregião, distante 80 km da capital, Maceió (**Figura 7**). Possui clima subúmido, característico de zona litorânea, com uma área de 1.002 km². É o segundo maior município de Alagoas em dimensão territorial, apresenta temperatura média anual de 24,4 °C e população de 52.130 habitantes segundo estimativa do IBGE, censo 2010.

5.2.2 Município de Palmeira dos Índios

Situado a 140 km de Maceió, Palmeira dos Índios (9°25’12.59’’S e 34°38’22.76’’O), pertencente à microrregião de mesmo nome, está localizado em região de pleno Agreste (**Figura 7**). Apresenta clima quente e úmido, com máximas de 38º C e mínimas de 12º C. Como biomas, apresenta Caatinga e Mata Atlântica e fauna constituída por animais silvestres comuns a região, tais como cassacos, preás, saguis e raposas. Merece destaque, na região, a produção de milho, refletida na presença da Indústria de Pipocas Boni, situada numa das comunidades rurais de Palmeira dos Índios, o Povoado Bonifácio. Segundo estimativas do IBGE, censo 2010, o município conta com aproximadamente 70.368 habitantes e uma população rural superior a 18.758 residentes.

5.2.3 Município de Olho D'Água do Casado

Na Mesorregião do Sertão, oeste de Alagoas, a pesquisa ocorreu no município de Olho D'Água do Casado (9°59'18.03''S e 35°58'09.31''O), microrregião Sertão do São Francisco (**Figura 7**). A distância de Maceió é em torno de 270 km. Apresenta clima tropical semiárido, com chuvas de verão e vegetação basicamente formada por Caatinga. As principais atividades econômicas do município são o comércio, serviços, agropecuária, atividades de extrativismo vegetal e silvicultura. População estimada de 8.491 habitantes, dos quais 4.464 são moradores de áreas rurais, segundo o sendo censo de 2010 do IBGE.

5.3 Tipo de estudo

Este estudo trata-se de uma investigação analítico-descritiva, transversal e observacional.

5.4 População em estudo

Neste estudo, foram incluídos indivíduos de ambos os sexos, de qualquer idade, provenientes dos municípios alagoanos de Coruripe (funcionários da Usina Coruripe), Palmeira dos Índios (indivíduos residentes em sítios e povoados) e Olho D'Água do Casado (indivíduos residentes em assentamentos) e que concordaram em participar da pesquisa após esclarecimento sobre o estudo. A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndices A e B) por cada indivíduo foi o único critério adotado para se fazer a inclusão ou a exclusão dos mesmos neste estudo.

5.5 Coleta de amostras séricas e dados epidemiológicos.

Inicialmente, em cada local, foi realizada palestra sobre a hantavirose (destacando-se os principais sintomas, meio de transmissão, fatores de risco associados e medidas de prevenção) objetivando esclarecer os trabalhadores quanto à doença e sensibilizá-los quanto à importância do estudo. Após explicação sobre a pesquisa, os indivídios foram convidados a participar do inquérito e, dos que concordaram, foram recolhidas as assinaturas dos TCLEs, seguido do cadastramento dos participantes, os quais responderam a perguntas elaboradas em um questionário padrão (**Apêndice C**) (**Figura 8**). Os participantes foram identificados por sequência numérica crescente, seguido da letra inicial do nome do município de origem, assim, por exemplo, os tubos com as amostras oriundas de Palmeira dos Índios foram marcadas com a letra "P".

Foram coletadas amostras de 4 mL de sangue por venopunção de cada participante (**Figura 8**) em tubo a vácuo (Labor Import®) de 4ml sem anticoagulante por profissionais voluntários da área da saúde (enfermeiros, biólogos, biomédicos, farmacêuticos ou técnicos em enfermagem). Para este procedimento foram utilizadas agulhas de coleta a vácuo descartáveis (Descarpack®) ou seringas descartáveis com agulha (5 ml).

Os tubos foram deixados por 30 minutos em temperatura ambiente para formação do coágulo, e a seguir, as amostras foram colocadas em caixas de isopor contendo gelo até a chegada ao laboratório (LAPEVI/ICBS/UFAL), onde os tubos foram centrifugados (centrífuga Bio Eng BE-4004) a 1500 rpm por 5 minutos. O soro foi separado, e dividido em alíquotas em tubos de 1,5 ml, tipo *eppendorfs*, perfazendo um total médio de três frações por amostra e estocados a -20ºC até o momento do teste para detecção de anticorpos anti-hantavírus pelo método de ELISA - *enzyme linked immunosorbent assay* (MORELI, 2005).

Figura 8- Fotos das palestras de esclarecimento e coletas.

Nota: Palestra, assinatura do TCLE, obtenção de dados epidemiológicos e coleta de amostras sanguíneas dos indivíduos participantes dos inquéritos para hantavírus, nos municípios de Coruripe (A), Palmeira dos Índios (B) e Olho D`Água do Casado (C).

Fonte**:** Autora, 2013.

5.6 Análise sorológica

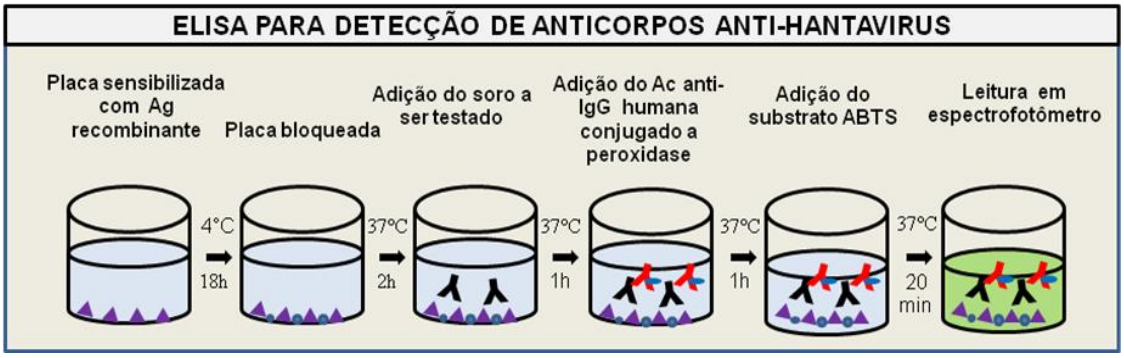
Os soros humanos foram testados para a presença de anticorpos IgG anti-hantavírus, através da técnica ELISA. Para os ensaios foi utilizada a proteína N recombinante do hantavírus brasileiro Araraquara (rN ARAV), desenvolvida pela expressão total do gene S em *Escherichia coli* (linhagem selvagem BL21) (FIGUEIREDO et al, 2008) e purificada utilizando resina de ácido nitrilo-acético carregada com níquel (Ni-NTA) (QIAGEN, EUA) (MORELI, 2005). A proteína foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Luis Tadeu Moraes Figueiredo (CPV-FMRP-USP).

Nos testes sorológicos, foram utilizadas placas hidrofóbicas de poliestireno de média afinidade e de fundo plano com 96 poços (Greiner Bio-one®). Para sensibilização, as placas foram divididas em duas partes, das linhas A-D (das colunas 1 a 12) foi utilizado como antígeno a proteína rN ARAV purificada (por cromatografia de afinidade) e das linhas E-H (colunas 1 a 12) utilizou-se o antígeno negativo, que era a fração purificada (em igual sistema) de extrato de *E.coli* BL21 sem plasmídeo. Para ambos os antígenos manteve-se a quantidade de 2µL/poço em solução tampão carbonato-bicarbonato (0,05M; pH: 9,6) (**Anexo A**), sendo utilizado um volume de 50 µl por poço. Os poços H11-12 não foram sensibilizados com qualquer um dos antígenos (branco). As placas foram mantidas em câmara úmida a 4° C por 16 a 18 horas. Em seguida, foram lavadas 6 vezes com solução de lavagem [tampão fosfato-salino, contendo 0,1% de Tween 20 (PBS-T)] (**Anexo A**) e bloqueadas com 150 µl de solução de bloqueio [10% de leite em pó desnatado (LPD) em PBS-T] e mantidas em estufa a 37° C por 2 horas, seguida de 6 lavagens com PBS-T (FIGUEIREDO et al., 2009) (**Figura 9**).

Posteriormente foram adicionados os soros a serem testados. As amostras foram diluídas (1:100) em solução de bloqueio, as quais foram testadas em duplicata (50µl/poço) e com correspondente para a porção sensibilizada com extrato purificado de *E. coli*. Como controle positivo foi utilizado soro sabidamente reagente, oriundo de paciente em fase convalescente de SPCVH, e como controle negativo foi utilizado soro não-reagente para a presença de anticorpos anti-hantavírus, procedente de indivíduo que nunca teve contato com o vírus (50 µl/poço), gentilmente cedidos pelo professor Dr. Luiz Tadeu Figueiredo (CPV-FMRP-USP). As placas foram incubadas em câmara úmida, estufa (Fabbe®), por 1 hora a 37° C, para formação do complexo antígeno-anticorpo, e em seguida lavada 6 vezes com solução de lavagem (FIGUEIREDO et al., 2009) (**Figura 9**).

Na etapa seguinte, foi adicionado aos poços o anticorpo anti IgG humana conjugado a peroxidase (Sigma®), na diluição 1:2000 em PBS-T 10% LPD. As placas foram imediatamente incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37° C, com posterior lavagem (6 vezes com solução de lavagem) e adição de 100µl substrato enzimático ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt) (Invitrogen®). As placas foram, então, mantidas em estufa a 37°C por 20 minutos. O substrato adicionado é convertido à cor verde, sendo a coloração proporcional à quantidade de anticorpo. As placas foram lidas em espectrofotômetro leitor de ELISA (ThermoPlate®) com filtro de 405nm, sendo valores expressos como densidade óptica (D.O) (**Figura 9**) (FIGUEIREDO et al., 2009).

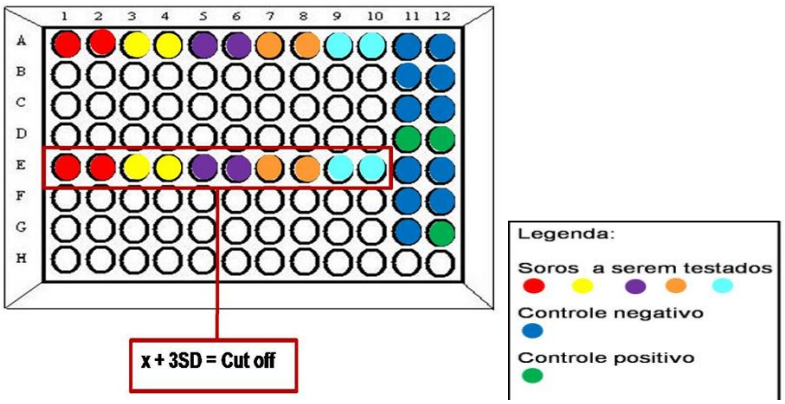
Figura 9- Representação esquemática do ensaio imunoenzimático, ELISA, para detecção de anticorpos anti-hantavírus.



Fonte: Adaptado de Santos-Júnior, 2012.

As D.O. obtidas dos soros originários dos poços revestidos com a proteína rN ARAV tiveram subtraídos os valores obtidos para os mesmos soros que reagiram frente ao antígeno negativo, resultando nas D.O. líquidas. O valor do ponto de corte (*cutt-off*) determinante dos soros positivos foi obtido a partir da média das D.O. dos poços sensibilizados com extrato de *E. coli* – antígeno negativo, acrescido três vezes o desvio-padrão (**Figura 10**). Foram consideradas reagentes as amostras cujas D.O. obtidas apresentaram valor superior ao observado para o ponto de corte (FIGUEIREDO et al., 2009).

Figura 10- Representação esquemática da distribuição dos soros em placa de poliestireno frente ao teste ELISA.



Fonte: Santos-Junior, 2012.

5.7 Elisa Semi-Quantitativo

As amostras soropositivas na triagem seguiram para a determinação dos títulos de anticorpos, realizando-se diluições seriadas em fator 100 (1:100 a 1:12800) e repetindo o protocolo de reação descrito para o teste qualitativo, em cada uma das diluições do soro. Todas as diluições foram realizadas em duplicata e o título (inverso da diluição) de cada soro foi considerado como a recíproca da maior diluição onde se observou reagente a duplicata.

5.8 Análise estatística

Para avaliar as possíveis associações entre a soropositividade e as variáveis demográficas e epidemiológicas estudadas (gênero, faixa etária, ocorrência de moradia e trabalho desenvolvido em outros estados, histórico de doença com insuficiência respiratória e de contato com roedor) foi utilizado o programa *InStat3* (*GraphPad, Software*, EUA) para os cálculos e análises estatísticas, sendo aplicado o Teste Exato de Fisher, quando analisadas duas pequenas populações ou o teste de Kruskal-Wallis, quando se compararam três ou mais grupos independentes, tendo sido considerado significantes quando $p \leq 0,05$, em ambas as situações.

6 RESULTADOS

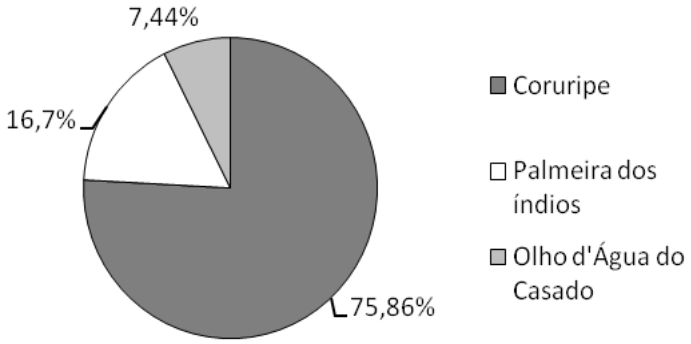
Participaram do estudo 928 indivíduos voluntários, a maioria composta por trabalhadores rurais de Alagoas, dos quais foram obtidos dados demográficos, como idade e gênero, e dados epidemiológicos (exposição a roedores, atividade laboral desenvolvida, histórico de doença respiratória e moradia ou trabalhos desenvolvidos em outros estados), bem como amostras séricas para pesquisa de anticorpos IgG anti-hantavírus (**Tabela 4**). As amostras foram distribuídas entre os três municípios da seguinte forma: 75,86 % (n=704) provenientes de Coruripe, 16,7 % (n=155) oriundas de Palmeira dos Índios e 7,44 % (n=69) advindas de Olho D'Água do Casado (**Gráfico 2**). Os resultados serão apresentados a seguir, para cada uma das localidades.

Tabela 4- Características gerais dos participantes dos inquéritos em Alagoas.

Características	Municípios					
	Coruripe		Palmeira dos Índios		Olho D'Água dos Casado	
	Total de voluntários (n=704)		Total de voluntários (n=155)		Total de voluntários (n=69)	
	N°	%	N°	%	N°	%
Gênero						
Feminino	1	0.14	108	69.68	38	55.07
Masculino	703	99.86	47	30.32	31	44.93
Contato com roedores	529	75.14	94	60.65	63	91.30
Doença com insuficiência respiratória	133	18.89	17	10.97	20	28.99
Morou em outros	238	33.81	35	22.58	30	43.48
Trabalhou em outros estados	179	25.43	3	1.94	12	17.39

Fonte: Autora, 2013

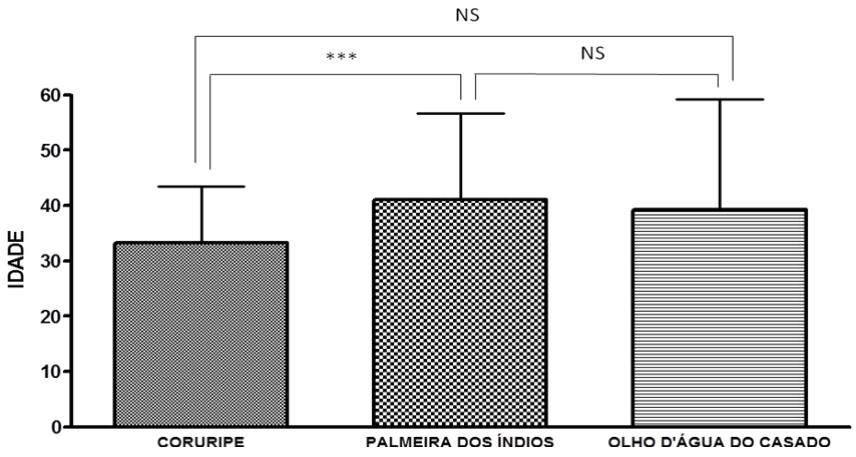
Gráfico 2- Proporção da participação de trabalhadores rurais de cada município no inquérito sorológico para hantavírus no estado de Alagoas.



Fonte: Autora, 2013

Neste estudo, a média de idade foi de 35 anos (sd= 12,59), com mediana de 32 anos (mínima de 9 e máxima de 92 anos). Quando comparadas as médias de idade, considerando-se cada município isolado, verificou-se diferença estatística significante entre as idades dos participantes, sendo de 33,3 anos para Coruripe e de 41,05 anos para Palmeira dos índios (**Gráfico 3**) (p<0,001; Teste Kruskal-Wallis).

Gráfico 3- Média de idades de todos os participantes dos inquéritos sorológicos para hantavírus em Alagoas.



Legenda: NS= Não significativo; ***= p>0,001.

Fonte: Autora, 2013

6.1 Inquérito sorológico em Coruripe

Dos 704 trabalhadores rurais da Usina Coruripe (1,35% da população total do município de Coruripe) a média de idade foi de 33,3 anos e mediana de 31 anos (com variação de 18 a 66 anos (sd.= 10,18), sendo quase totalidade do sexo masculino, com exceção de uma representante do sexo feminino (0,14%). Do total de amostras, 54 apresentaram reatividade na pesquisa de anticorpos IgG anti-hantavírus, com títulos iguais ou superiores a 200 (**Tabela 5**), o que corresponde a uma prevalência de anticorpos nesta amostragem de 7,67%.

Tabela 5- Casos reagentes para anticorpos IgG anti-hantavírus, em trabalhadores rurais da Usina Coruripe/AL, segundo o código de registro do participante voluntário, título, idade, trabalhos realizados em outros estados, presença de doença grave com sintoma respiratório, residência em outros estados e ocorrência de doença crônica.

(continua)

Registro do participante	Título	Idade (anos)	Trabalhos fora de Alagoas	História de doença grave com sintoma respiratório	Residiu fora de Alagoas	Presença de doença crônica
28C	200	50	Não	Não	São Paulo	Não
59C	200	29	Não		Não	Não
71C	200	34	Não	Não	Não	Não
77C	200	54	Sergipe	Não	Sergipe	Não
79C	200	31	Paraná	Não	Paraná	Não
91C	3200	32	Não	Não	Não	Não
100C	200	32	Não	Não	Não	Não
180C	200	35	Não	Não	Não	Não
182C	200	28	Não	Não	Não	Não
275C	200	38	MG e TO	Não	MG e TO	Não
284C	200	37	Não	Não	Não	Não
323C	400	24	Não	Não	Não	Não

Tabela 5- Casos reagentes para anticorpos IgG anti-hantavírus, em trabalhadores rurais da Usina Coruripe/AL, segundo o código de registro do participante voluntário, título, idade, trabalhos realizados em outros estados, presença de doença grave com sintoma respiratório, residência em outros estados e ocorrência de doença crônica.

(continuação)

Registro do participante	Título	Idade (anos)	Trabalhos fora de Alagoas	História de doença grave com sintoma respiratório	Residiu fora de Alagoas	Presença de doença crônica
328C	200	21	Não	Sim	Não	Não
331C	200	42	Não	Não	Não	Não
344C	200	29	Não	Não	Não	Não
351C	200	30	Não	Não	Não	Não
376C	800	32	Não	Não	Não	Não
382C	400	49	MG	Não	MG e SP	Não
390C	200	30	Não	Não	Goiás	Não
420C	400	23	Não	Não	Não	Não
434C	200	20	Não	Não	Não	Não
437C	400	37	Não	Não	Sergipe	Não
438C	200	45	Não	Não	Não	Não
439C	400	28	Não	Não	Não	Não
457C	200	24	Não	Não	Não	Não
460C	400	18	Não	Não	Não	Não
479C	800	44	Não	Sim	Pernambuco	Não
530C	200	37	Não	Não	Não	Não
589C	400	27	Não	Não	Não	Não
611C	400	37	Não	Não	Não	Não
628C	200	22	Não	Não	Não	Não
637C	200	21	Não	Não	Não	Não
638C	200	48	Não	Não	Sergipe	Não
639C	400	50	Não	Sim	Não	Não

Tabela 5- Casos reagentes para anticorpos IgG anti-hantavírus, em trabalhadores rurais da Usina Coruripe/AL, segundo o código de registro do participante voluntário, título, idade, trabalhos realizados em outros estados, presença de doença grave com sintoma respiratório, residência em outros estados e ocorrência de doença crônica.

(conclusão)

Registro do participante	Título	Idade (anos)	Trabalhos fora de Alagoas	História de doença grave com sintoma respiratório	Residiu fora de Alagoas	Presença de doença crônica
650C	400	35	MG	Não	Minas Gerais	Não
656C	200	21	Não	Não	Não	Não
662C	200	23	Não	Não	Não	Não
664C	200	28	Não	Não	Não	Não
668C	200	34	Não	Não	Não	Não
670C	200	19	Não	Sim	Rio de Janeiro	Não
683C	400	21	Não	Não	Não	Não
733C	400	47	ES	Não	ES e GO	Não
741C	400	46	Não	Sim	Não	Não
745C	200	52	Não	Não	Não	Não
756C	800	39	Não	Não	Não	Não
778C	400	43	Não	Não	Não	Não
781C	800	29	Não	Não	Não	Não
794C	1600	26	Não	Não	Não	Não
803C	200	66	Não	Não	Não	Não
811C	200	33	Não	Não	Não	Não
829C	200	21	Não	Sim	Sergipe	Não
849C	200	28	Não	Não	Não	Não
875C	400	47	Não	Não informou	Não	Não
886C	400	35	MG	Sim	Minas Gerais	Não

Nota: Em cinza destacam-se as amostras que apresentaram altos títulos e cujos participantes relataram nunca terem morado fora do estado de Alagoas. Em laranja, as amostras reagentes para a presença de anticorpos anti-hantavírus com títulos de 200 e 400 e cujos indivíduos afirmaram já ter sofrido de doença grave com insuficiência respiratória no passado, sem nunca ter morado em outros estados.

Fonte: Autora, 2013.

A **tabela 6** mostra o número de amostras sororreagentes distribuídas conforme o título de anticorpos que apresentaram no teste semi-quantitativo. Destaca-se que entre as amostras reagentes houve seis (11,11%) amostras com títulos muito altos (800, 1600 e 3200). Chama especial atenção os participantes que apresentaram altos títulos e que referiram nunca terem morado nem trabalhado fora de Alagoas (0,71%; 5/704) (destacados em cinza na **Tabela 2**: voluntários 91C, 376C, 756C, 781C e 794C). Também é relevante destacar aqueles participantes (0,43%; 3/704) que apresentaram anticorpos anti-hantavírus em títulos variados (200 e 400) e que afirmaram que sofreram de doença com insuficiência respiratória, febre e mialgia no passado e que nunca moraram fora de Alagoas (destacados em laranja na **Tabela 5**: voluntários 328C, 639C e 741C).

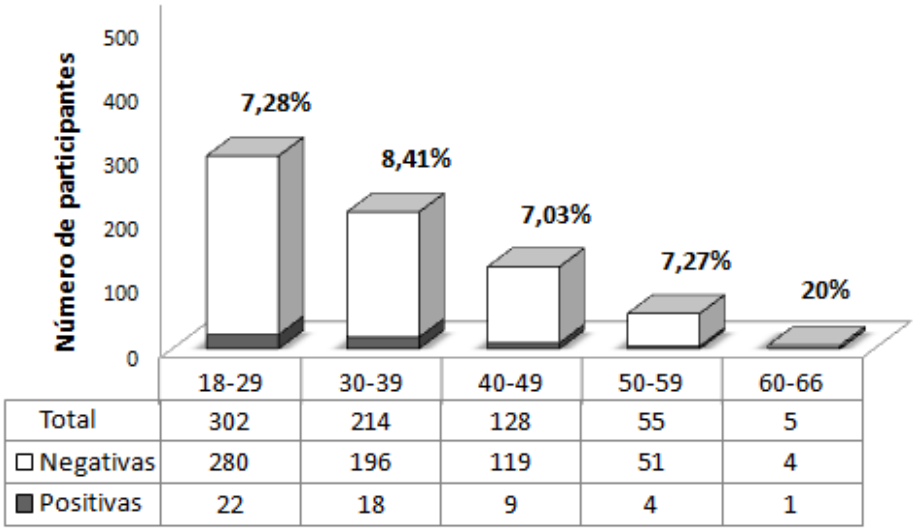
Tabela 6- Títulos reagentes para anticorpos IgG anti-hantavirus, em trabalhadores rurais da Usina Coruripe.

Número de amostras por título	Título de anticorpos IgG anti-hantavírus
34	200
14	400
4	800
1	1600
1	3200

Fonte: Autora, 2013.

Dentre as 54 amostras sororreagentes, a maioria, em números absolutos, foi de adultos jovens (n=22), entretanto quando analisada a relação entre o número de indivíduos sororreagentes e o número total de amostras estudadas por faixa etária, verificou-se uma maior prevalência de reatividade para a presença de anticorpos IgG anti-hantavírus entre os indivíduos idosos (60-66 anos) (1/5) (**Gráfico 4**).

Gráfico 4- Total de participantes (positivos e negativos) e percentagem de amostras sororreagentes, segundo a faixa etária, no inquérito em Coruripe.



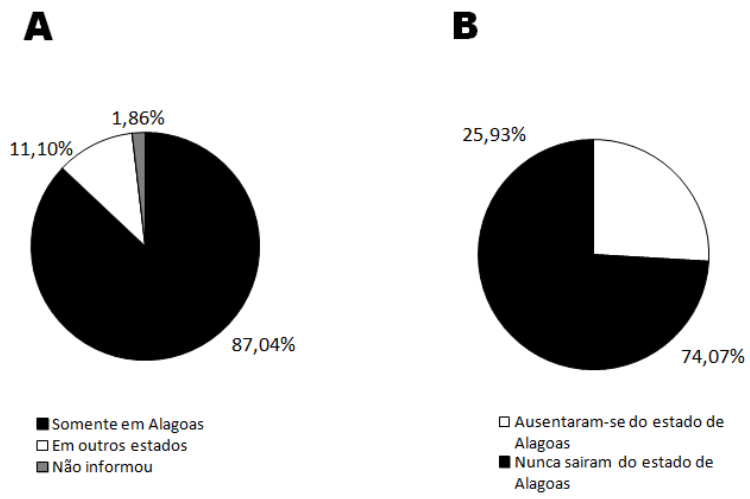
	18-29	30-39	40-49	50-59	60-66
Total	302	214	128	55	5
Negativas	280	196	119	51	4
Positivas	22	18	9	4	1

Fonte: Autora, 2013.

Em relação aos dados epidemiológicos, foi observada significância estatística entre o total de indivíduos sororreagentes que afirmaram nunca terem trabalhado fora de Alagoas (47/54; 87,04%) e os que relataram ter desenvolvido atividades (n=6/54) laborais em outros estados (p=0,0232; Teste exato de Fisher). Do mesmo modo, houve significância estatística entre os indivíduos positivos que relataram ter residido por toda vida no Estado (n=40; 74,07%) e os que em algum momento da vida viveram em outras unidades da federação (n=14; 25,93%) (p=0,0307; Teste exato de Fisher) (**Gráfico 5**). Ainda, dos 54 indivíduos sororreagentes 7 (12,96%) afirmaram ter tido algum tipo de doença grave na qual sentiram febre associada à falta de ar e dor no corpo (**Tabela 5**, em laranja). Entretanto, quando aplicado o Teste Exato de Fisher, não foi verificada significância estatística entre a presença de anticorpos IgG anti-hantavírus e o histórico de doença com insuficiência respiratória no passado (p=0,6983).

Assim, apesar da ausência de sintomas respiratórios na maioria dos participantes com sorologia reagente, a detecção de anticorpos anti-hantavírus em indivíduos sem histórico de moradia ou trabalhos em outros estados, sugere a ocorrência de casos de infecção autóctone por hantavírus no estado de Alagoas.

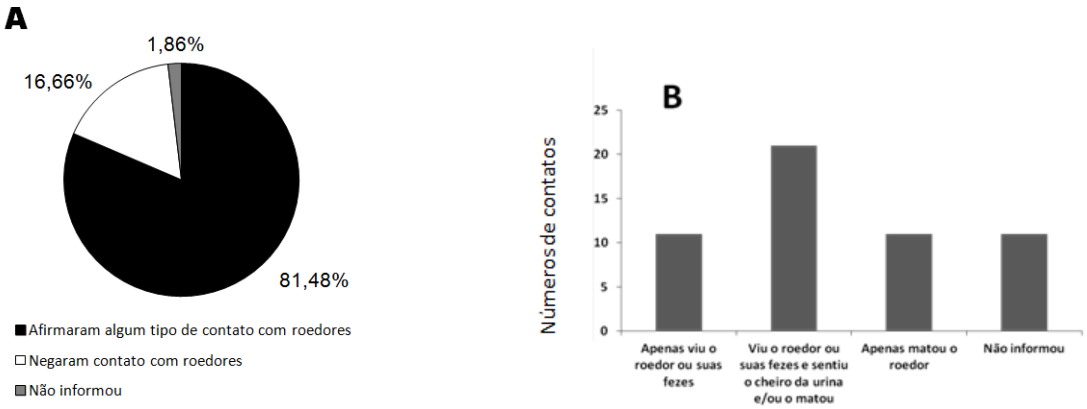
Gráfico 5- Histórico de trabalho desenvolvido em outros estados relatado pelos participantes com resultado positivo para a pesquisa de anticorpos IgG anti-hantavírus do inquérito em Coruripe (A) e percentagem destes participantes que afirmaram já terem estado em outros estados (B).



Fonte: Autora, 2013.

Dos 54 participantes sororreagentes, 44 (81,49%) relataram já terem tido algum tipo de contato com roedores e houve diferença estatística significativa entre positividade para hantavírus e contato com roedores (p=0,0003; Teste Exato de Fisher) (**Gráfico 6**) (**Apêndice C**).

Gráfico 6- Histórico de tipo de contato com roedor dos participantes reagentes para a pesquisa de anticorpos IgG anti-hantavírus no inquérito em Coruripe (A) e tipos de contato com roedores mais frequentes entre as respostas (B).



Fonte: Autora, 2013.

6.2 Inquérito sorológico em Palmeira dos Índios

Neste grupo, obteve-se a participação de um total de 155 indivíduos (0,22% da população do município de Palmeira dos Índios), entre os quais 91 trabalhadores rurais (58,71%) e 64 indivíduos exercendo diferentes funções, sendo as mais representativas as seguintes: donas de casa (n=17; 10,97%), professores (as) (n=9; 5,81%) e estudantes (n=8; 5,16%), oriundos de seis povoados de Palmeira dos Índios apresentados na **tabela 7**.

Tabela 7- Povoados de origem das amostras do município de Palmeira dos Índios.

Povoados e/ou sítios visitados	Número de amostras por povoado e/ou sítio	Percentagem (%)
Cabaceiro	07	4,52
Sítio Bem-te-vi	31	20
Batingas	16	10,32
Sítio do Meio	30	19,35
Alto Vermelho Velho	11	7,1
Canafístula	60	38,71

Fonte: Autora, 2013.

Os 155 voluntários apresentaram média de idade de 41,05 anos (sd=15,7) e mediana de 39 anos (com variação de 15 a 77 anos), sendo 108 do sexo feminino (69,68%) e 47 do sexo masculino (30,32%). Do total, 139 (89,68%) eram naturais deste município, sendo a vizinha Paulo Jacinto, a segunda cidade com o maior número de representantes (4/155; 2,58%). Ainda, do total, 120 (77,42%) voluntários afirmaram nunca terem morado fora do Estado e apenas três relataram terem desenvolvido atividades laborais em outro estado.

Das 155 amostras analisadas, três apresentaram reatividade na pesquisa de anticorpos IgG anti-hantavírus, portanto a prevalência foi de 1,94% (**Tabela 8**). Todas as amostras reagentes eram de participantes procedentes do município de Palmeira dos Índios e do sexo feminino, cuja média de idade foi de 37,67 anos e apresentaram título de 200. Assim como no inquérito em Coruripe, os resultados com títulos de 100 foram desconsiderados.

Do total de participantes sororreagentes, nenhum relatou ter sofrido de doença com insuficiência respiratória no passado. Dos três positivos, dois (66,67%) afirmaram nunca terem morado e nem trabalhado em outros estados fora de Alagoas, e dois relataram manter contato com roedores. O tipo de contato descrito foi a visualização do mamífero ou de suas fezes, em um dos casos, e no outro, além de visualizar o animal ou suas fezes, somou-se a percepção do odor da urina seguida de morte do roedor com uso de veneno (**Tabela 8**).

Tabela 8- Casos reagentes para anticorpos IgG anti-hantavírus em indivíduos de Palmeira do Índios, segundo o código de registro do participante voluntário, título, idade, trabalhos realizados em outros estados, presença de doença grave com sintoma respiratório, residência em outros estados e ocorrência de doença crônica.

Registro do participante	Título	Idade (anos)	Trabalhos fora de Alagoas	Histórico de doença grave com sintoma respiratório	Residiu fora de Alagoas	Presença de Doença Crônica
26P	200	25	Não	Não	São Paulo	Não
41P	200	43	Não	Não	Não	Não
117P	200	45	Não	Não	Não	Não

Fonte: Autora, 2013.

6.3 Inquérito sorológico em Olho D'Água do Casado

No inquérito realizado em Olho D'Água do Casado participaram 52 trabalhadores rurais (75,37%), oito donas de casa (11,59%), e sete estudantes (10,14%), um trabalhador de obras (1,45%) e um indivíduo que declarou não ter ocupação (1,45%), totalizando 69 residentes do assentamento Nova Esperança Vilas I, II e III, o que corresponde a 0,81% da população deste município. Deste total, 31 eram do sexo masculino (44,93%) e 38 do sexo feminino (55,07%). Para este inquérito a média de idade dos participantes foi de 39,26 anos (sd= 19,97) e mediana de 37 anos (variando entre 9 e 92 anos).

Das 69 amostras analisadas, duas foram reagentes para a presença de anticorpos IgG anti-hantavírus (prevalência de 2,9%), apresentando títulos de 200 e 400 e média de idade de 42 anos. Ambos afirmaram nunca terem desenvolvido doença com sintoma respiratório e relataram contato com roedores, sendo este do tipo visual e olfativo, acrescido, em um dos casos, da morte do animal por meio do uso de veneno (**Tabela 9**).

Uma das amostras sororreagentes (título 400) é proveniente de um trabalhador rural que também desenvolveu atividade de borracheiro, 70 anos, analfabeto, natural do município de Pariconha. Relatou já ter trabalhado em usina nos estados de Alagoas e Bahia e ter morado na Bahia, São Paulo e Sergipe. Este participante também afirmou ter contato com roedores, sendo que este variou desde o visual (roedor e fezes), sentir o cheiro da urina do animal até matar o mamífero com o auxílio de veneno e ainda negou ter sofrido de qualquer doença com sintoma respiratório.

A segunda amostra reagente (título 200) foi de uma estudante, 14 anos, procedente do município de Delmiro Gouveia, que afirmou nunca ter saído do estado ou ter tido qualquer doença que apresentasse dificuldade respiratória. No entanto, declarou ter contato frequente com roedores, sendo a visualização do animal ou de suas excretas e sentir o odor da urina, os tipos de contatos relatados.

Tabela 9- Casos reagentes para anticorpos IgG anti-hantavírus em indivíduos do município de Olho D'Água do Casado,segundo o código de registro do participante voluntário, título, idade, trabalhos realizados em outros estados, presença de doença grave com sintoma respiratório, residência em outros estados e ocorrência de doença crônica.

Registro do Participante	Título	Idade (anos)	Trabalho fora de Alagoas	História de doença grave com sintoma respiratório	Residiu fora de Alagoas	Presença de doença crônica
41O	400	70	BA	Não	BA, SP e SE	Não
58O	200	14	Não	Não	Não	Não

Fonte: Autora, 2013.

6.4 Resultados globais dos inquéritos sorológicos em Alagoas

No total, das 928 amostras analisadas 59 apresentaram reatividade para a presença de anticorpos anti-hantavírus contra proteína N do hantavírus Araraquara, para as quais foram obtidos valores de D.O. que variaram conforme o título, como pode ser visto na **Tabela 7**. Os títulos variaram entre 200 e 3200. Assim, o resultado dos inquéritos sorológicos tomados em conjunto determinaram uma prevalência de anticorpos IgG anti-hantavírus para o Alagoas de 6,36 % (**Tabelas 10 e 11**).

Tabela 10- Títulos reagentes para anticorpos IgG anti-hantavírus em 928 indivíduos do estado de Alagoas, e as respectivas D.O. médias obtidas em cada título.

Número de amostras por título	Título	D.O. média	D.O. mínima	D.O. máxima
38	200	0,729091	0,465	1,3215
15	400	0,843857	0,477	1,305
4	800	1,022875	0,71	1,268
1	1600	0,6795	0,668	0,691
1	3200	0,947	0,912	0,982

Fonte: Autora, 2013.

Tabela 11- Prevalência de anticorpos anti-hantavírus nas populações das três mesorregiões do estado de Alagoas.

Mesorregião	Município de coleta	Número de participantes	Soropositividade (%)
Leste	Coruripe	704	7,67
Agreste	Palmeira dos Índios	155	1,94
Sertão	Olho D'Água do Casado	69	2,9
Estado de Alagoas	**-**	**928**	**6,36**

Fonte: Autora, 2013.

Finalmente, foi verificado que 72,35% afirmaram nunca terem morado em outros Estados e entre os voluntários que apresentaram altos títulos (800, 1600 e 3200) todos disseram nunca ter trabalhado fora do estado e somente um referiu ter morado em outro estado. Assim, a detecção de anticorpos IgG anti-hantavírus em indivíduos que relataram sempre ter residido neste Estado ou nunca ter desenvolvido atividades laborais em outros estados, sugere a ocorrência de casos de infecção autóctone por hantavírus no estado de Alagoas.

7 DISCUSSÃO

Importante problema de saúde pública, a hantavirose desperta atenção especial devido à gravidade da SPCVH e a alta taxa de letalidade da doença registrada no Brasil. Contudo, infecções assintomáticas ou subclínicas podem ocorrer, como já foi demonstrado em diferentes locais, por exemplo, nas províncias de Los Santos e Veraguas, no Panamá, e nas regiões de Uberlândia e de São João Batista do Glória, ambas em Minas Gerais (ARMIEN et al., 2011; LIMONGI et al., 2009; R.C. SILVEIRA, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Passos, comunicação pessoal). Além disso, mesmo no caso de pacientes apresentando hantavirose com sinais e sintomas clássicos da SPCVH, a doença pode ser facilmente confundida com outras infecções virais, nos casos em que não é realizado o diagnóstico laboratorial (SESPA, 2013). Em ambas as situações, a real incidência da doença pode ser subestimada e nestes casos, os inquéritos sorológicos tornam-se boa estratégia para se conhecer a verdadeira prevalência das infecções por hantavírus em diferentes regiões por meio da detecção de anticorpos específicos anti-hantavírus nas populações (PINCELLI, 2003; FIGUEIREDO et al., 2000; BADRA et al., 2012).

Em vista disso, este trabalho realizou inquéritos sorológicos em uma parcela (0,03%) da população alagoana para determinação da prevalência de anticorpos IgG anti-hantavírus no estado de Alagoas. Estudos prévios realizados no LAPEVI-ICBS-UFAL demonstram evidências da ocorrência de infecções por hantavírus em território alagoano, quando se detectaram anticorpos IgG em amostras de soro provenientes de pacientes acamados com doença aguda de diversas etiologias (SANTOS-JÚNIOR, 2012; MELO e SILVA et al., 2011). Todavia, naqueles estudos não foram encontradas amostras reagentes para IgM anti-hantavírus nem a presença de genomas virais. Além disso, o Ministério da Saúde não apresenta nenhuma notificação de SPCVH em Alagoas, sendo, por isso, considerada uma zona silenciosa para a infecção por hantavírus. O estudo de áreas silenciosas para hantavirose no Brasil é uma das metas da Secretaria de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde (DECIT, 2008). Diante dos indícios iniciais da presença de infecção autóctone, houve a necessidade da realização de um estudo mais abrangente, utilizando amostragens das diferentes mesorregiões alagoanas para corroborar a ocorrência de infecções por hantavírus.

Desta pesquisa participaram 928 indivíduos procedentes dos municípios alagoanos: Coruripe, Palmeira dos Índios e Olho D'Água do Casado, escolhidos de forma estratégica por estarem localizados em cada uma das mesorregiões que compõem o estado: Leste, Agreste e Sertão, respectivamente.

A mesorregião do Leste possui extensa área de produção caniveira substitutiva à Mata Atlântica retirada desde a época colonial. Sendo assim, é possível que a alta soroprevalência verificada no inquérito em trabalhadores rurais da Usina Coruripe (7,67%) esteja relacionada ao fato destes desenvolverem atividade laboral com contato diário em canaviais, o que aumenta o risco de exposição à infecção por hantavírus. Segundo o IBGE (2010) Alagoas é o principal estado produtor de cana-de-açúcar na região Nordeste. No estado de São Paulo, o trabalho em canaviais tem sido apontado como umas das principais formas de infecção, assim como no estado do Mato Grosso, um dos mais afetados, os casos de hantavirose têm sido associados a atividades agrícolas, como cultivo de soja, milho, feijão e outros (FIGUEIREDO, 2001; FIGUEIREDO et al., 2003; BEPA, 2007; ROSA et al., 2011).

As alterações ambientais provocadas por atividades agrícolas e desmatamentos interferem na transmissão da hantavirose. A introdução de fontes de alimentação propicia o aumento rápido na densidade populacional destes animais em áreas ocupadas pelo homem, facilitando a transmissão do hantavírus. Entre as principais culturas que atuam dessa forma, tem destaque a cana-de-açúcar, o arroz, o capim braquiária e colonião e o milho. Além disso, o cultivo da cana-de-açúcar está associada à redução de muitas espécies de animais selvagens, como os predadores de roedores e assim estes se concentram em regiões mais próxima ao homem, tais como *Necromys lasiurus* (BEPA, 2007; DONALISIO et al., 2008; DEARING & DIZNEY, 2010; FIGUEIREDO et al., 2010; JONSSON et al., 2010; MILLS et al., 2010; GIMAQUÉ et al., 2012).

Da população analisada nesta mesorregião (município de Coruripe), 81,48% referiram algum tipo de contato com roedores, sendo predominante a visualização do animal ou de suas fezes, apresentando, esta população, soroprevalência de 7,67% para a presença de anticorpos IgG anti-hantavírus. Alta prevalência também foi verificada por Badra e colaboradores (2012), 4,7%, para a presença de anticorpos anti-hantavírus na região de Cássia dos Coqueiros-SP, igualmente região de Mata Atlântica.

Na Mesorregião do Agreste, no município de Palmeira dos Índios, foi verificada soroprevalência de 1,94% para a presença de anticorpos IgG anti-hantavírus, sendo possível que este valor esteja associada à produção local de milho, refletida na presença da Indústria de

Pipocas Boni localizada em um dos povoados deste município, Bonifácio. Os roedores silvestres consomem todos os tipos de grãos, no entanto o milho parece ser o mais palatável e atrativo para estes animais. Segundo o Manual sobre hantavirose (DIVE, 2006), a maioria dos casos registrados no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Argentina envolve trabalhadores em lavouras de milho, seja no plantio direto ou na colheita. Esta cultura gera grandes perdas nas fases de colheita e armazenamento, disponibilizando alimento para os roedores. Estes animais ao buscarem sustento e abrigo, deixam, nestes locais, suas excretas, que quando infectadas podem transmitir hantavírus.

Ainda, tomando-se por base os conhecimentos sobre a hantavirose na região do Cerrado brasileiro, o clima seco favorece a ocorrência de casos de infecções humanas por hantavírus (DONALISIO et al., 2008). Desse modo, a localização do município de Olho D'Água do Casado, na Mesorregião do Sertão, com seu clima muito seco, foi considerada estratégica para a busca de evidências de infecções por hantavírus, sendo demonstrado neste trabalho prevalência de 2,9% para anticorpos IgG anti-hantavírus. Estes dados corroboram os achados de Lima e colaboradores (2011), que em estudo desenvolvido no Ceará, onde a caatinga ocupa parte território, verificaram prevalência de 2,8% para anticorpos de memória anti-hantavírus em soros de pacientes com suspeita de dengue. Assim, acredita-se que o clima seco favoreça a ocorrência das infecções humanas por hantavírus, uma vez que, em geral, é na época seca que ocorre a colheita e os trabalhadores ficam mais expostos à infecção. Ao mesmo tempo em que desloca roedores selvagens famintos a locais mais próximos dos seres humanos em zonas rurais, em busca de grãos colhidos e outros tipos de alimento (PINCELLE et al., 2003; DONALISIO et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2011; NUNES et al., 2011).

Em outros estados do Nordeste brasileiro, a exemplo do Maranhão, onde Mendes e colaboradores (2004) realizaram inquérito sorológico com 74,4% da população de duas aldeias (Quebra e Jerônimo) da área rural do município de Anajatuba, foi verificado soroprevalência de 13,3%. Os autores sugeriram a circulação de hantavírus nesta região e análises filogenéticas indicaram a ocorrência de uma nova espécie patogênica causadora de SPCVH no Brasil, o vírus Anajatuba (MENDES et al., 2004; ROSA et al., 2005; MENDES et al., 2010). Na Bahia, após o registro de infecção aguda por hantavírus em 1996, Mascarenhas-Batista e colaboradores (1998) realizaram inquérito sorológico em escolares na cidade de Salvador, obtendo-se uma prevalência 13,2% para a presença de anticorpos contra o vírus *Hantaan*. Neste mesmo estado, em estudo recente, realizado na cidade de Ilhéus, verificou-se soroprevalência de 0,6% para a presença de anticorpos anti-hantavírus Araraquara, entre os

anos de 2008 e 2009, no qual, os autores afirmam se tratar de casos de infecção autóctone (MORELI et al., 2012).

Em outros inquéritos sorológicos foram verificadas prevalências de 14,3% em Jardinópolis-SP (CAMPOS et al., 2003), 0,6% no estado do Amazonas (GIMAQUE et al., 2012) e 2,3% em Turvo-SC (PEREIRA et al., 2012) salientando-se que os participantes constituiam população sadia e sem histórico de doença respiratória. Em Minas Gerais, detectou-se 3% de positividade para anticorpos IgG anti-hantavírus (LIMONGI et al., 2009), 13% no estado do Mato Grosso (SANTOS et al., 2011) e 1,97% em Santa Catarina (SOUZA et al., 2012).

Em outros países da América foi observada soroprevalência de 0,72% de anticorpos IgG anti-hantavírus entre chilenos (FREY et al., 2003), 6,5% na Argentina, Província Jujuy (PINI et al., 2003), 3,5% e 7,34% em Córdoba na Colombia, utilizando como antígeno os vírus Araraquara e Maciel, respectivamente (GUZMÁN et al., 2013), 9,1 e 12,2% entre moradores da Província Chapare e Mineros na Bolívia, respectivamente, nas quais há maior prevalência entre os trabalhadores rurais (MONTGOMERY, 2012; CRUZ et al., 2012). No Panamá foi verificada alta soroprevalência em crianças menores de 11 anos (9,2%), atingindo 22,8% em adultos com idades entre 41-50 anos (ARMIEN et al., 2004) e Gonzales e colaboradores (2001) verificou prevalência de anticorpos de 0,7% no sudoeste dos EUA contra o vírus *Sin Nombre*.

A prevalência global, considerando os três inquéritos realizados neste estudo em Alagoas, foi de 6,36% e é possível que esta alta taxa esteja relacionada à intensa atividade agrícola, que promove uma maior exposição aos roedores possivelmente infectados por hantavírus.

Neste estudo, a idade média global foi de 35 anos. Mendes e colaboradores (2010) associaram a idade superior aos 20 anos à presença de anticorpos IgG anti-hantavírus em indivíduos no Maranhão. Brasil (2010) refere a faixa etária entre 20 e 39 anos como a mais acometida pela SPCVH no Brasil e Souza e colaboradores (2012) verificaram que 87,5% dos participantes reagentes tinham mais de 30 anos de idade. De modo semelhante, Nunes e colaboradores (2011) verificaram que, entre 1996 e 2008, os 320 casos de hantavirose confirmados no Cerrado brasileiro apresentaram média de idade de 31 anos.

A análise estatística demonstrou diferença significativa entre a faixa etária dos participantes com sorologia positiva para a presença de anticorpos IgG anti-hantavírus nas populações dos inquéritos nos município de Coruripe e de Palmeira dos índios ($p<0,001$). Apesar de o último ter apresentado a maior média de idade (41,05 anos) dentre os municípios

estudados, neste também foi verificada a menor soroprevalência (1,94%). Isto pode ser decorrente da composição da população local estudada, já que em Palmeira dos Índios 69,68% dos participantes foram de indivíduos do sexo feminino. Casos de hantavirose tendem a estarem associados ao gênero masculino, uma vez que este, em geral, está mais exposto e por isso mais suscetível a infecção por hantavírus (FERREIRA, 2003).

Observou-se, ainda, neste estudo significância estatística entre a ocorrência de infecção de acordo com o sexo, sendo possível que indivíduos do sexo masculino estejam sob maior risco de infecção por hantavírus (p=0,0001). Estes achados corroboram o estudo de Souza e colaboradores (2011), no qual é observado aumento de soropositividade entre os homens. Isto porque a atividade agrícola proporciona maior contato com as zoonoses de roedores, e os homens, constituem, na maioria dos casos, a maior parte da mão de obra rural. Entretanto, neste trabalho estes resultados podem estar associados a viés de aferição, uma vez que 84,16% dos participantes eram do sexo masculino (781/928).

Outro parâmetro de risco associado às infecções é o histórico de contato com roedores. Apesar disso, neste estudo, considerando-se os dados globais, não houve diferença estatística significativa entre o contato com roedores e a presença de anticorpos IgG anti-hantavírus. Acredita-se que a taxa total (55,93%) esteja subestimada, em decorrência de um viés de aferição. Foi observado no inquérito em Coruripe (origem de 75,86% das amostras), que quando o pesquisador-entrevistador era do sexo feminino, o número de respostas negativas à pergunta "Costuma ter contato com ratos?" dada pelos participantes era maior do que aquela observada quando o entrevistador era do sexo masculino. Especulamos que os trabalhadores tenham ficado inibidos em assumir que costumavam ter contato com esses animais.

É possível supor que este contato pudesse estar ocorrendo sem que o indivíduo tomasse conhecimento. Uma vez que alguns participantes, apesar de terem respondido não quando indagados sobre a ocorrência desse contato, declararam na questão seguinte, que tratava do tipo de contato, as diversas formas de relação com estes animais. Assim, quando estes também foram contabilizando, foi demonstrada significância estatística entre a soropositividade e a ocorrência de algum tipo de contato com roedores.

Em estudo semelhante desenvolvido por Santos e colaboradores (2013), no Mato Grosso, 59,3% da população referiram contato prévio direto com roedores e suas excretas, e 46,3% afirmaram armazenar grãos no ambiente peridomiciliar, sendo que esta conduta propícia o aparecimento destes animais (BEPA, 2007). Em inquérito sorológico no Maranhão, região endêmica para hantavirose, foi relatado por Mendes e colaboradores (2010) que 24,3% dos entrevistados afirmaram ter tido contato com roedores e indicam que a infecção tinha

características ocupacionais associadas a trabalhos agrícolas. Pereira e colaboradores (2012) detectaram, em Santa Catarina, que todos os participantes reagentes viviam em zonas rurais ou áreas periurbanas e que metade eram agricultores e, a exceção de um, todos tinham contato com roedores. Já no estudo realizado por Gimaque e colaboradores (2012), essa taxa foi ainda maior, 80% das amostras positivas tiveram origem da aréa rural. Ainda, no presente estudo, de modo semelhante ao verificado por Medeiros e colaboradores (2010), também foi detectada soropositividade para anticorpos de memória anti-hantavírus em duas donas de casa e um estudante, isto porque, por vezes, estes têm participação importante na agricultura de subsistência.

Neste estudo foram consideradas positivas somente as amostras com títulos iguais ou superiores a 200. Os soros com reatividade em título de 100 foram desconsiderados para se evitar qualquer resultado falso-positivo, uma vez que estudo anterior do grupo (SANTOS-JUNIOR et al., 2011; SANTOS-JUNIOR, 2012) demonstrou reatividade cruzada da proteína rN ARAV contra anticorpos chagásicos e de indivíduos com leishmaniose, doenças endêmicas no estado de Alagoas. Especula-se que este fato deva-se à ativação da produção de anticorpos policlonais em doenças crônicas, tal como Doença de Chagas e Leishmaniose, no entanto a reatividade cruzada foi eliminada em diluições maiores.

Dentre as amostras reagentes demonstradas neste estudo, os títulos variaram de 200 a 3.200, havendo predomínio nas diluições 1:200 e 1:400 que corresponderam a 89,83% do total das amostras positivas (53/59). Estes baixos títulos podem ser decorrentes do longo tempo de infecção por hantavírus, como demonstrado por Manigold e colaboradores (2010), que verificou que após quatro anos de infecção há redução na resposta imune contra a proteína N, passando então a glicoproteína Gn, a ser o antígeno dominante. Ainda, é possível especular que os baixos títulos sejam consequência de infecção por espécie de virulência reduzida, causando quadros clínicos mais brandos (oligossintomáticos) (SOUZA et al., 2012). De modo semelhante, no Chile, onde apesar da ausência de história de pneumonia ou admissão hospitalar, foi verificada a presença de anticorpos IgG contra hantavírus, o que segundo os autores sugere a ocorrência de infecção inaparente (FREY et al., 2003). Esta hipótese, é corroborada pelo estudo de Santos-Júnior (2012) que, ao realizar pesquisa de anticorpos IgM anti-hantavírus em pacientes internados em hospitais alagoanos, não observou positividade nas amostras analisadas, embora os pacientes apresentassem quadro clínico compatível com SPCVH. De modo semelhante, Medeiros e colaboradores (2010) verificaram baixa positividade de anticorpos IgM entre os indivíduos assintomáticos ou

oligossintomáticos, sugerindo a ocorrência de casos menos severos ou de infecções atípicas, bem como a possibilidade de subnotificação dos casos.

Em estudo recente, 1.129 representantes de populações panamenhas foram analisadas por meio de inquéritos sorológicos repetidos nas mesmas populações com intervalo de tempo de seis anos entre as coletas. Este demonstrou a soroconversão para hantavírus em 70 indivíduos, sendo que, destes, apenas 5 apresentaram SPCVH. Nos demais indivíduos que passaram a apresentar anticorpos anti-hantavírus na circulação não houve qualquer história de enfermidade ou hospitalização por doença respiratória aguda (ARMIEN et al., 2011). Raboni e colaboradores (2007) relataram que durante a rotina de avaliação epidemiológica na região central do Brasil, no mesmo local em que realizavam a captura de roedores, encontravam alta soroprevalência de hantavírus em indivíduos que nunca haviam relatado sintomas de SPCVH. GUZMÁN e colaboradores (2013), em estudo realizado na Colômbia, verificaram a presença de anticorpos IgM, demontrando infecção aguda, no entanto não havia sintomas ou doença aparente. Esses estudos reforçam a hipótese levantada com os achados da presente investigação, de que em Alagoas é possível que circule alguma espécie de hantavírus de reduzida patogenicidade, exigindo-se estudos posteriores para se desvendar esta questão.

É sabido que, em inúmeros locais do Brasil ocorrem casos de hantavirose sem o correto diagnóstico, a exemplo do que ocorreu em Santa Catarina, onde após a suspeita de infecção em agricultor residente em área de reflorestamento, iniciou-se estudo e outros casos foram identificados (SCHIMIDT et al., 2007). Em Sri Lanka foi detectada infecção por hantavírus entre suspeitos de leptospirose, sendo sugerido pelos autores que a hantavirose, pode ser uma doença subnotificada naquele país (GAMAGE et al., 2011). Desse modo, é também possível que tal cenário de infecções subnotificadas também esteja ocorrendo em Alagoas.

Considerando, ainda, o fato de que, em geral, só procura o atendimento médico os pacientes que desenvolvem a forma grave da hantavirose, outra proposição possível, é que para os casos de infecção por hantavírus possa ser aplicada a Teoria do *Iceberg*. Na qual apenas parte dos casos chamam a atenção (os mais graves, em analogia à ponta do *iceberg*), enquanto que uma grande porção das infecções fica abaixo do horizonte clínico e, portanto, não são identificados. É relevante, pois, identificar a real incidência da infecção (inclusive a parte submerssa do *iceberg*) para que se possa convenientemente preveni-las. Nesse sentido, os inquéritos sorológicos são ferramentas para se evidenciar tais infecções subclínicas.

Outra hipótese para explicar a prevalência dos anticorpos encontrada nos participantes deste estudo seria que, de forma semelhante ao visto por outros autores (MACNEIL et al., 2010; PEREIRA et al., 2012), nesta pesquisa também se destacaram seis das amostras reagentes por apresentarem títulos muito altos (800, 1600 e 3200), as quais poderiam ter desempenhado papel importante na limitação da infecção e da patogênese induzida pelo vírus. Nesse sentido, trabalhos recentes que exploram a resposta humoral de memória imunológica contra hantavírus em indivíduos que sobreviveram à SPCVH têm demonstrado novos aspectos da relação título de anticorpos *vs* gravidade da doença durante a enfermidade aguda. Assim, apesar de ainda não estar completamente claro qual o exato papel desempenhado por anticorpos IgG no controle da infecção, uma possível explicação é que a sua produção seja um forte fator preditor de sobrevivência dos indivíduos infectados pelo vírus *Sin Nombre* (MACNEIL et al., 2010).

Até recentemente, acreditava-se que a resposta humoral aos hantavírus fosse principalmente dirigida contra epítopos imunodominantes da proteína N, embora todas as proteínas estruturais (Gn, Gc, N) sirvam como fonte para epítopos. Grupos que estudam a resposta imune dos indivíduos que foram acometidos por hantavirose têm demonstrado que embora a proteína N de fato induza altos títulos de anticorpos durante a doença aguda, os anticorpos dirigidos contra as glicoproteínas do envelope, especialmente Gn, é que teriam, realmente, papel efetor no *clearance* viral e na proteção contra a doença de maior gravidade (WOO et al., 2005; PADULA et al., 2007; MANIGOLD et al., 2008; MANIGOLD et al., 2010). Neste contexto, embora a proteína N seja a mais conservada e abundante durante a infecção (enquanto as glicoproteínas estão mais expostas e variáveis) - fazendo dela a mais susceptível à ação do sistema imunológico e facilmente acessíveis aos anticorpos, especula-se que possivelmente esta proteína contribua para a evasão viral, por mecanismo de distração/desvio da resposta humoral daquelas que seriam realmente protetoras, as glicoproteínas do envelope viral (KRÜGER et al., 2010; MANIGOLD et al., 2010).

Tomando por base estudos desenvolvidos por outros autores (DE CARVALHO NICACIO et al., 2002; LIMONGE et al., 2009; MACNEIL et al., 2010; MENDES et al., 2010), que consideraram apenas como reagentes amostras cujos títulos foram iguais ou superiores a 400, e sendo aplicado o mesmo critério para os inquéritos em Alagoas, a taxa de soroprevalência sofre redução para 2,26% (21/928), o que corrobora o achado de 3% visto por Limongi e colaboradores (2009) para Minas Gerais. Ainda assim, essa prevalência corrobora a hipótese de infecção autóctone por hantavírus em Alagoas, uma vez que, destes 21 indivíduos, 71,43% afirmaram sempre terem morado no estado de Alagoas (15/21).

Durante a realização dos testes ELISA foi observado que 20 amostras apresentaram reação colorimétrica nos poços sensibilizados com extrato de *E. coli* e uma explicação para este fato é a possível presença de anticorpos anti- *E. coli* em algumas das amostras séricas testadas. Por este motivo, para a leitura das placas foi padronizado descontar o valor das D.O. dos poços sensibilizados com *E. coli* daqueles sensibilizados com rN ARAV (MORELI et al., 2005), evitando-se deste modo resultados falsos positivos. Assim, as D.O. observadas nas amostras aqui testadas apresentaram valores (em torno de 0,799) superiores aos vistos em testes realizados no Centro-Oeste brasileiro (em torno de 0,090) (MORELI, 2012, Universidade Federal de Goiás; comunicação pessoal). Acredita-se que esta discrepância deva-se a maior infecção da população alagoana por *E. coli*, quando comparada à população de outras unidades da federação. Um dos principais meios de infecção por *E. coli* é o hídrico. No estado de Goiás 2,02% das amostras do sistema de abastecimento de água (SAA) apresentam infecção por *E. coli* (BRASIL, 2011b) e em São Paulo este valor foi de 0,85% (BRASIL, 2011c), enquanto que no estado de Alagoas este valor foi de 12,94% (BRASIL, 2011a), sendo, portanto, 6,4 e 15,22 vezes respectivamente maior do que em GO e SP, de acordo com o Sistema Nacional de Vigilância em Saúde (2011). Esta diferença deve estar associada aos menores índices de saneamento básico em Alagoas (ausência de água encanada e tubulações de esgotos) e, ainda a reduzidas condições socioeconômicas, proporcionando maior contato com coliformes fecais, incluindo, *E. coli* (IBGE, 2010). Estes dados corroboram a ideia de que distintos aspectos epidemiológicos relacionados às infecções por hantavírus variam em diferentes regiões do Brasil (SANTOS et al., 2011).

Em todos os testes foi utilizada como antígeno a proteína N recombinante do vírus brasileiro Araraquara, principal responsável pelas notificações de hantaviroses na região do Cerrado brasileiro, atingindo área que vai do Estado de São Paulo até o Estado do Maranhão (NUNES et al., 2011). A proteína N é a mais conservada entre os hantavírus e por causa disso o compartilhamento de epítopos entre os representantes do gênero *Hantavirus* pode resultar em reação cruzada contra a proteína N de outros hantavírus, endêmicos de diferentes regiões, a exemplo dos vírus *Andes* e Araraquara (TISCHLER et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; RIGO et al., 2012). Outro exemplo foi o inquérito realizado no Maranhão que verificou a presença de anticorpos anti-hantavírus contra antígenos recombinantes de *Sin Nombre* na população, embora os hantavírus presentes nesse estado sejam o Anajatuba e o Rio Mearim (MENDES et al., 2004). Entretanto, como já mencionado por outros autores, a possibilidade de reação cruzada não deve ser vista como desvantagem metodológica, uma vez que permite a identificação de outras espécies de hantavírus, o que se faz extremamente importante, uma

vez que na hantavirose o diagnóstico precoce é fundamental para a sobrevência do paciente e o atraso na detecção pode contribuir para uma elevada taxa de mortalidade (DE CARVALHO NICACIO et al., 2002; MORELI et al. 2012). Ainda, neste estudo foram utilizadas placas de média afinidade, uma vez que estas são mais hidrofóbicas de que as placas de poliestireno de alta afinidade, devido ao caráter hidrofóbico (não polar) da proteína rN ARAV (ALMINAITE et al., 2006).

A partir dos dados aqui apresentados e considerando a pequena extensão territorial do estado de Alagoas, é possível especular que assim como foram encontrados anticorpos IgG anti-hantavírus na população de três dos municípios alagoanos, os outros também podem ter a infecção. De forma semelhante, Mendes e colaboradores (2010), por meio de inquérito sorológico, verificaram a presença de anticorpos anti-hantavírus em seis municípios maranhenses, determinando prevalência global de 4,7%, sendo sugerindo pelos autores ampla distribuição da hantavirose para o estado do Maranhão.

Em suma, os inquéritos sorológicos realizado neste estudo indicam a circulação de hantavírus no estado de Alagoas, tratando-se, provavelmente de casos de infecção autóctone. Entretanto, algumas questões associadas a esta pesquisa ainda necessitam verificação em estudos futuros, tais como: qual a patogenicidade da espécie viral circulante em Alagoas? Circularia entre os roedores e causaria infecções mais de uma espécie de hantavírus? Seriam estes vírus distintos causadores de doenças clínicas, sendo a maioria delas de pouca gravidade? Que espécies de roedores são responsáveis pela transmissão de hantavirose no estado de Alagoas? Mais estudos são necessários a fim de elucidar tais questões.

8 CONCLUSÕES

- A partir da analise sorológica foi verificada a presença de anticorpos anti-hantavírus em indivíduos das três mesorregiões, determinando alta prevalência (6,36%) para o estado de Alagoas quando comparada a estudos realizados em outras regiões do país onde a SPCVH é conhecida.
- Foram identificados prováveis casos de infecções autoctónes por hantavírus, a partir de indivíduos positivos que relataram nunca terem se ausentado do estado.
- Com base no inquérito sorológico, sugere-se a circulação de hantavírus no Estado de Alagoas.
- Sugere-se, diante da ausência de histórico de doença grave entre a maioria dos indivíduos sororreagentes que a(s) espécie(s) circulante(s) seja(m) de baixa patogenicidade.
- Estudos complementares são necessários para detecção de anticorpos em roedores, identificação da(s) espécie(s) circulante(s) e conhecer a(s) espécie(s) transmissora(s) do vírus no estado.

REFERÊNCIAS

ALMINAITE, A. et al. Oligomerization of hantavirus nucleocapsid protein: analysis of the coiled-coil domain N-terminal. **Journal of Virology**,v. 80, n.18, p. 9073-81, 2006.

ARAUJO, J. **Detecção Molecular de Hantavírus pela Técnica de Real-time PCR em amostras de roedores silvestres coletadas na região do Vale do Ribeira no Estado de São Paulo.** Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2010.

ARAUJO, J. et al. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in Sao Paulo, Brazil. **Bio Med Central Research Notes**, v.5, p. 690, 2012.

ARMIEN, B. et al. High seroprevalence of hantavirus infection on the azuero Peninsula of Panama. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 6, p. 682-687, 2004.

ARMIEN, B. et al. F. Incidence Rate for Hantavirus Infections Without Pulmonary Syndrome, Panama. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n.10, p.1936-1939, 2011.

BADRA, S. J. et al. A retrospective serologic survey of hantavirus infections in the county of Cássia dos Coqueiros, state of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n. 4, 2012.

BAGAMIAN, K. H. et al. Transmission Ecology of Sin Nombre Hantavirus in Naturally Infected North American Deer mouse Populations in Outdoor Enclosures. **Plos one.** v. 7, n.10, 2012.

BEPA: Boletim Epidemiológico Paulista. Publicação sobre agravos à Saúde Pública, v. 4, n 47, 2007. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa47_hanta.htm. Acesso em: 13 de fevereiro de 2013.

BHARADWAJ, M. et al.. Humoral immune responses in the Hantavirus cardiopulmonary syndrome. **The Journal of Infectious Disease,** v.182, n.1, p.43-8, 2000.

BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J.A. E D'ANDREA, P.S. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos / - Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa – **Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde**, 2008.

BORGES, A.A. et al. Hantavirus cardiopulmonary syndrome: immune response and pathogenesis. **Microbes and Infection**, v. 8, n.8, p. 2324-2330, 2006.

BORGES, A. A; FIGUEIREDO, L. T. M. Atualização de conhecimentos sobre a patogênese da Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavírus. **Revista de Patologia Tropical,** v.36, n.3, p.191-204, 2007.

BORGES, A. A; FIGUEIREDO, L. T. M. Mechanisms of shock in Hantavírus Pulmonary Syndrome. **Current Opinion in Infections Diseases**, v. 21, p.293-297, 2008.

BRAGA, C. A. C. **Estrutura de comunidade de pequenos mamíferos em áreas afetadas por plantações de milho (Zea mays) e estradas na Serra do Ouro Branco, Minas Gerais.** 79p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Biomas Tropicais) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Informe Técnico nº 3/2005 – Situação Epidemiológica da Hantavirose. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância epidemiológica. - 8 ed. rev. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Alagoas/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.– 5. ed. – Brasília : **Ministério da Saúde**, 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Relatório de situação: Goiás/ Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde.– 5. ed. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Relatório de situação: São Paulo / Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde.– 5. ed. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2011c.

CABELO, C.; CABELO F. Zoonosis con reservorios silvestres: Amenazas a la salud pública y a la economia. **Revista Médica de Chile**, v. 136, n.3, p. 385-393, 2008.

CAMPOS, G.M. et al. Serological survey of hantavirus in Jardinopolis County, Brazil. **Journal of Medical Virology,** v. 71, n.3, p. 417-22, 2003.

CAMPOS, G.M. et al. Síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus: aspectos clínicos de um doença emergente no sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n. 3, p.282-289, 2009.

CARNEIRO, K. S. J. G.; CARNEIRO, C. S. Abordagem clínico-imunológica da infecção grave por Hantavirus. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 2, p.183- 191, 2008.

CARROLL, D. et al. Hantavirus pulmonary syndrome in central Bolivia: relationships between reservoir hosts, habitats, and viral genotypes. The **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, n.1, p. 42–46, 2005.

CASTILLO ORÉ, R. M. et al. S. Serologic Evidence for Human Hantavirus Infection in Peru. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 8, 2012.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention - Laboratory management of agents associated with hantavirus pulmonary syndrome: interim biosafety guidelines. **MMWR**, v.43, n.RR-7, 1994.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention - Hantavirus Pulmonary Syndrome in Visitors to a National Park — Yosemite Valley, California, 2012. **MMWR**, v. 61, n. 46, 2012.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention - International HPS Cases. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hantavirus/surveillance/international.html>. Acesso em 25 março, 2013.

CHEN, W.; KONKEL, J. E. TGF-β and 'Adaptive' Foxp3þ Regulatory T cells. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 30–36, 2010

CHIORATTO, G.T.S. et al. Soroprevalência da infecção por Hantavírus em roedores do estado do ceará, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 1, p. 1-6, 2010.

CLEMENT, J. et al. A unifying hypothesis and a single name for a complex globally emerging infection: hantavirus disease. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease,** v.31, n.1, p.1–5, 2012.

CORREIA, M. D.; SOVIERZOSKI, H.H. Ecossistemas marinhos : recifes, praias e manguezais / Mônica Dorigo Correia, Hilda Helena Sovierzoski. – Maceió: **EDUFAL**, 55p., 2005.

COSTA, R. S. **Avaliação do desempenho do modelo de mesoescala MM5 na simulação de eventos de precipitação extrema no Estado de Alagoas.** 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

CRUZ, C. D. et al. Novel Strain of Andes Virus Associated with Fatal Human Infection, Central Bolivia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 750-757, 2012.

DA SILVA, M.V. et al. Hantavirus Pulmonary Syndrome. Report of the first three cases in São Paulo, Brazil, **Revista do Instituto de Medicina Tropical,**v. 39, n.4, p.231-4, 1997.

DAUD, N.H. et al. of infection of Hokkaido virus (Genus Hantavirus) among grey red-backed voles, Myodes rufocanus, in Hokkaido, Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n.11, p.1081-90, 2007.

DEARING, M. D.; DIZNEY, L. Ecology of hantavirus in a changing world. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1195, p. 99–112, 2010.

DE CARVALHO NICACIO, C.et al. Cross-Protection against Challenge with Puumala Virus after Immunization with Nucleocapsid Proteins from Different Hantaviruses. **Journal of Virology,** v. 76, n. 13, p. 6669–6677, 2002.

DÉCIT. Informativo Décit. Resultados de Pesquisas, Departamento de Ciência e Tecnologia, da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, **Ministério da Saúde**, n.2, 2008. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_hantavirose.pdf>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2012.

DIVE - Diretoria de Vigilância Epidemiológica. MANUAL SOBRE HANTAVIROSE. Secretaria de Estado Da Saúde de Santa Catarina, Sistema Único de Saúde, **Diretoria de vigilância epidemiológica**. 2006.

DONALISIO, M. R. et al. Aspectos climáticos em áreas de transmissão de hantavirose no Estado de São Paulo, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.24, n.5, p.1141-1150, 2008.

DOURNON, E. et al. HFRS after a wild rodent bite in the hautesavoie and risk of exposure to hantaan-like virus in Paris laboratory. **The Lancet**, v.1, n 8378, p. 676-7, 1984.

EASTERBROOK, J. D.; ZINK, M.C.; KLEIN, S. L. Regulatory T cells enhance persistence of the zoonotic pathogen Seoul virus in its reservoir host. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, n. 39, p.15502-7, 2007.

ELETROBRÁS. Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento – LACTEC. Universidade Federal de Alagoas. – UFAL. Estado de Alagoas: atlas eólico. **EDUFAL**, cap. 1, p. 1-12. 2008. Disponível em: <http://www.desenvolvimentoeconomico.al.gov.br/minas-e-energia/mapa-eolico/ATLAS_EOLICO_AL_cap01.pdf/view>. Acesso em: 14 set 2011.

ELKHOURY, M. R. et al. Hantavirus pulmonary syndrome: prognostic factors for death in reported cases in Brazil: Trans. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.106, n.5, p. 298-302, 2012.

ELLIOTT, R. Emerging viruses: the bunyaviridae. **Molecular Medicine**, v. 3, n. 9, p. 572-577, 1997.

FERREIRA, R. V. **Geomorfologia da região de Japaratinga, AL**. 1999. 86 f. Dissertação. Mestrado em Geociências, Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Pernambuco.

FERREIRA, M.S. Hantaviroses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p.81-96, 2003.

FIGUEIREDO, L.T.M. Vírus brasileiros da família Bunyaviridae. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 32, p. 154-158, 1999.

FIGUEIREDO, L.T. M. et al. Contribuição sobre a hantavirose no Brasil. **Informe Epidemiológico do SUS**, v.9, p. 167-178, 2000.

FIGUEIREDO, L.T.M, CAMPOS, G. M. E RODRIGUES, F. B. Síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavírus: aspectos epidemiológicos, clínicos, do diagnóstico laboratorial e do tratamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.1, p. 13-23, 2001.

FIGUEIREDO, L. T. M. et al.Hantaviruses in São Paulo State, Brazil. **Emerging Infectious Disisease**, v. 9, n.7, p. 891-892, 2003.

FIGUEIREDO, L. T. M. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.2, p. 203-210, 2006.

FIGUEIREDO, L. T. M. et al. Expression of a hantavirus N protein and its efficacy as antigen in immune assays**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n.7, p. 596-599, 2008.

FIGUEIREDO, L. T. M. et al.. Hantavirus pulmonary syndrome, central plateu, southeastern, and southern Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 4, p.561-56, 2009.

FIGUEIREDO, G. G. et al. Diagnosis of hantavirus infection in humans and rodents in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.43, n.4, p. 348-354, 2010.

FIGUEIREDO, G. G. et al. Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome in Ribeirão Preto, Brazil, 2010-2011.**Virus Reviews and Research,** p.40-43, 2011.

FELDMANN, H. et al. Utilization of autopsy RNA for the synthesis of the nucleocapsid antigen of a newly recognized virus associated with hantavirus pulmonary syndrome. **Virus Research**, v. 30, n. 3, p. 351–367, 1993.

FREY, M.T. et al. Hantavirus prevalence in the IX region of Chile. **Emerging Infectious Diseases Atlanta**, v.9, n.7, p.827-832, 2003.

GAMAGE, C. D. et al. Serological evidence of Thailand vírus-related Hantavirus infection among suspected leptospirosis patients in Kandy, Sri Lanka. **Journal of Infection**. v. 64, n.1, p.72-75, 2011.

GAVRILOVSKAYA, I.N. et al. β3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of American,** v. 95, n. 12, p. 7074–7079, 1998.

GAVRILOVSKAYA, I. et al. Cellular Entry of Hantaviruses Which Cause Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Is Mediated by b3 Integrins. **Journal of virology**, v. 73, n. 5, p. 3951–3959, 1999.

GIMAQUE, J. B. L.; et al. Serological evidence of hantavirus infection in rural and urban regions in the state of Amazonas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n.1, p: 135-137, 2012.

GLASS, B. G. E. et al. Association of intraspecific wounding with hantaviral infection in wild rats (Rattus norvegicus). **Epidemiology and Infection**, v.101, n. 2, p. 459-472, 1988.

GOODIN, D. G. et al. Microhabitat characteristics of Akodon montensis, a reservoir for hantavirus, and hantaviral seroprevalence in an Atlantic forest site in eastern Paraguay. **Journal of Vector Ecology**, v. 34, n. 1, p. 105-113, 2009.

GOMES DE LIMA, J. **Levantamento bibliográfico sobre a epidemiologia da hantavirose, com ênfase nos dados nacionais**. 51f. Trabalho de conclusão de curso. Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alagoas. 2012.

GOOGLE EARTH. Disponível em: < http://www.google.com/earth/index.html>. Acesso em: 18 de julho de 2013.

GONZALES, L. M. et al. Prevalence of antibodies to Sin Nombre virus in humans living in rural areas of southern New Mexico and Western Texas. **Virus Research**, v.74, p.177-9, 2001.

GROEN, J. et al. Class and subclass distribution of Hantavirus-specific serum antibodies at different times after the onset of nephropathia epidemica. **Journal Medical Virology**, v.43, n.1, p. 39-43, 1994.

GUO, W. et al. Phylogeny and Origins of Hantaviruses Harbored by Bats, Insectivores, and Rodents**. PLOS Pathogens**, v. 9, n.2, 2013.

GUZMÁN, C. et al. Prevalence of antibody to hantaviruses in humans and rodents in the Caribbean region of Colombia determined using Araraquara and Maciel virus antigens **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n.2, 2013.

HEPOJOKI, J. et al. Hantavirus structure – molecular interaction behind the scene. **Journal of General Virology**, v. 93, p. 1631-1644, 2012.

HJELLE, B. et al. Detection of Muerto Canyon virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from patients with hantavirus pulmonary syndrome. **The Journal of Infectious Diseases,** v. 170, n. 4, p.1013-7, 1994.

HJELLE, B; TORRES-PÉREZ, F. Hantaviruses in the Americas and Their Role as Emerging Pathogens. **Viruses**, v.2, n. 12, p 2559-2586, 2010.

HEYMAN, P. et al. In search for factors that drive hantavirus epidemics. **Frontiers in Physiology,** v. 3, n. 1, 2012.

HINSON, E.R. et al. Wounding: the primary mode of Seoul virus transmission among male Norway rats. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n.3, p. 310-7, 2004.

HOFMANN, J. et al. Hantavirus infections by Puumala or Dobrava-Belgrade virus in pregnant womem. **Journal of Clinical Virology,** v. 55, n. 3, p. 266-9, 2012.

HOWARD, M.J. et al. Hantavirus Pulmonary Syndrome in Pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 6, p.1538–44, 1999.

HUJAKKA. H. et al. Diagnostic rapid tests for acute hantavirus infections: specific tests for Hantaan, Dobrava and Puumala viruses versus a hantavírus combination test. **Journal of Virological Methods,** v. 108, n. 1, p.117–122, 2003.

HUTCHINSON, K. L.; ROLLIN, P. E.; PETERS, C. J. Pathogenesis of a North American hantavirus, Black Creek Canal virus, in experimentally infected Sigmodon hispidus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.59, n. 1, p. 58-65, 1998.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, volume 37, 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Síntese de indicadores sociais, 2010. Uma análise das condições de vida da população brasileira. Disponível: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/0000000144.pdf>. Acesso em 15 de janeiro de 2013.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em 25 março, 2013.

IVERSSON, L. B. et al. Infecção Humana por Hantavírus no Sul e Sudeste do Brasil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 40, n. 2, p. 85-92, 1994.

IVERSSON, L. B. Doença Humana por Hantavírus. In: Veronesi R., Focaccia R. editores. **Tratado de infectologia,** 1ª edição, São Paulo, Atheneu, 219-228, 1996.

JOHNSON, A.M. et al. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. **Journal of Mededical Virology**, v.59, n. 4, p.527-535, 1999.

JONSSON, C. B.; FIGUEIREDO, L. T. M.; VAPALAHTI, O. A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 23, n.2, p. 412-441, 2010.

KALLIO, E. R. et al. Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 8, p. 2127-34, 2006.

KANG, H. J. et al. Novel Hantavirus in the Flat-Skulled Shrew (Sorex roboratus). **Vector-borne and zoonotic diseases**, v.10, n. 6, 2010.

KAUKINEN, P., A. VAHERI, AND A. PLYUSNIN. Hantavirus nucleocapsid protein: a multifunctional molecule with both housekeeping and ambas sadori alduties. **Archives Virology,** v. 150, n. 9, p. 1693–1713, 2005.

KHAIBOULLINA, S. F.; MORZUNOV, S. P.; JEOR, S. C. Hantaviruses: Molecular Biology, Evolution and Pathogenesis. **Current Molecular Medicine,** v. 5, n. 8, p. 773-790, 2005.

KHAN, A. S. et al. Hantavirus Pulmonary Syndrome: The First 100 US Cases. The **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n.6, p. 1297-1303, 1996.

KILPATRICK, E.D. et al. Role of specific CD8+ T cells in the severity of a fulminant zoonotic viral hemorrhagic fever, hantavirus pulmonary syndrome**. Journal Immunology,** v.172, n. 5, p. 3297-304, 2004.

KRÜGER, D. H.; SCHÖNRICH, G.; KLEMPA, B. Human pathogenic hantaviruses and prevention of infection. **Human Vaccines,** v.7, n.6, p.1-9; 2011.

KUKKONEN, S.K.; VAHERI, A.; PLYUSNIN, A. L protein, the RNA-dependent RNA polymerase of hantaviruses. **Archives of Virology**, v. 150, n.3, p.533-56, 2005.

LEDUC, J. W. et al. Isolation of a Hantaan related virus from Brazilian rats and serological evidence of its widespread distribution in South America. The **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**,v. 34, n. 4, p. 810-15, 1985.

LEDUC, J. W. et al. Global survey of antibody to Hantaan-related viruses among peridomestic rodents. **Bull World Health Organization**, v. 64, n.1, p. 139–144, 1986.

LEDUC, J.W. Epidemiology of hantaan and related viruses. American Association for **Laboratory Animal Science**, v.37, n.4, p.413-418, 1987.

LEDNICKY, J. A. Hantaviruses- a short review. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 127, n.1, p. 30-35, 2003.

LEE, H. W.; LEE, P. W.; JOHNSON, K. M. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v.137, n.3, p.298-308, 1978.

LEE, H.W.; VAN DER GROEN, G. Hemorrhagic fever with renal syndrome. **Progress Medical in Virology**, v. 36; p.62-102, 1989.

LIMA, D.M. et al. Hantavirus infection in suspected dengue cases from State of Ceará, Brazil. **Revista da Socieda Brasileira de Medicina Tropical,** v. 44, n. 6, p.795-796, 2011.

LIMONGI, J. E. et al. Cross-sectional Survey of Hantavirus Infection, Brazil. **Emerging Infectious Disease Journal**, v. 15, n.12, p.1981–1983, 2009.

LIN, J.T. et al.. TGF-beta 1 uses distinct mechanisms to inhibit IFN-gamma expression in CD4+ T cells at priming and at recall: differential involvement of Stat4 and T-bet. **Journal Immunology,** v. 174, n. 10, p.5950-8, 2005.

LINDERHOLM, M. et al. Elevated plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6, and IL-10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. **Journal Infecting Disease,** v.173, n.1, p. 38-43. 1996.

LONDOÑO A. F., LEVIS S., RODAS J. D. Hantavirus como agentes emergentes de importancia en Suramérica Biomédica. **Revista Del Instituto Nacional De Salud**, v. 31, n. 3, p. 451-64, 2011.

LUONG, L.. T. et al. Dynamics of Hantavirus Infection in Peromyscus leucopus of Central Pennsylvania. **Vector-borne and zoonotic diseases**,v.11, n. 11, p. 1469-54, 2011.

LYUBSKY, S. et al. Histopathology of Peromyscus leucopus naturally infected with pathogenic NY-1 hantavirus: pathologic markers of HPS viral infection in mice. **Laboratory Investigation**, v. 74, n. 3, p. 627-633, 1996.

MACNEIL, A. et al. Sin Nombre Virus–Specific Immunoglobulin M and G Kinetics in Hantavirus Pulmonary Syndrome and the Role Played by Serologic Responses in Predicting Disease Outcome. **The Journal of Infectious Disease**, v. 202, n. 2, 2010.

MCCAUGHEY, C. et al. Low pH-induced cytopathic effect-a survey of seven hantavirus strains. **Journal of Virological Methods**., v 81, p. 193–197, 1999.

MALECKI, T. M. et al. Serologic survey for hantavirus infection in domestic animals and coyotes from New Mexico and northeastern Arizona. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n.7, p. 970-3, 1998.

MAKELA, S. et al. More than half of the patients with acute Puumala hantavirus infection have abnormal cardiac findings. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.41, n.1, p.57-62, 2009.

MANIGOLD, T. et al. Case report: T-cell responses during clearance of Andes virus from blood cells 2 months after severe hantavirus cardiopulmonary syndrome. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n.11, p.1947-51, 2008.

MANIGOLD, T. et al. Highly differentiated, resting Gn-especific memory $CD8^+$ T cells persist years after infection by Andes Hantavirus. **Plos Pathogens**, v. 6, n.2, 2010.

MARQUES, R. V. O gênero Holochilus (Mammalla: Cricetldae) no Rio Grande do Sul: taxonomia e distribuição **REVISTA BRASILEIRA DE ZOOLOGIA**, v.4, n.4, p. 347-360, 1988.

MARTINEZ, V. P. et al. Person-to-person transmission of Andes virus. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 11, n.12, p.1848-1853, 2005.

MASCARENHAS-BATISTA, A. V. et al. Anticorpos anti-hantavirus em escolares de Salvador, Bahia. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**. v. 31, n. 5, p. 433-440, 1998.

MEDEIROS, D. B. et al. Circulation of hantaviruses in the influence area of the Cuiabá-Santarém Highway. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 105, n. 5, p. 665-671, 2010.

MELO-SILVA, C.R. et al. Characterization of hantaviruses circulating in Central Brazil. **Infectious Genetics and Evolution**, v.9, n.2, p. 241-7, 2009.

MELO E SILVA, J. et al. Surveillance For Human Hantavirus Infection In the State of Alagoas, Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 16 (Suppl 1), p.157-157, 2011.

MENDES, W. S. et al. Hantavirus Pulmonary Syndrome in Anajatuba, Maranhão, Brazil. Rev. **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v.43, n.4, 2001.

MENDES,W. S. et al. Hantavirus Infection in Anajatuba, Maranhão, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v.10, n.8, p.1496–1498. 2004.

MENDES, W. S. et al. Serologic Survey of Hantavirus Infection, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, 2010

MENDES JÚNIOR, B. O.Perfil econômico de Alagoas/ Biágio de Oliveira Mendes Júnior. – Fortaleza: **Banco do Nordeste**, 2002.

MEYER, B. J.; SCHMALJOHN, C.S. Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms.**Trends in Microbiology**, v. 8, n.2, p. 61-7, 2000.

MILLS, J. N. Regulation of Rodent-Borne viruses in the natural host: implications for human disease. **Archives of Virology**, v.19, p. 45-57, 2005.

MILLS, J. N. Biodiversity loss and emerging infectious disease: An example from the rodent-borne hemorrhagic fevers. **Biodiversity**, v. 7, n. 1, 2006.

MILLS, J. N.; AMMAN, B. R.; GLASS, G. E. Ecology of Hantaviruses and Their Hosts in North America. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 10, n. 6, 2010.

MONTGOMERY, J. M. et al. Hantavirus Pulmonary Syndrome in Santa Cruz, Bolivia: Outbreak Investigation and Antibody Prevalence Study, **Neglected Tropical Diseases,** v.6, n. 10, 2012.

MORELI, M. L. **Diagnóstico de hantavírus por detecção genômica com estudo filogenético e produção de proteína**. Ribeirão Preto, 2005. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

MORELI, M. L.; COSTA, V. G.; PARIZ, F. R. A seroepidemiological survey of hantavirus in Ilheus county. **American Journal of Virology**, v.1, n.1, p.18-23, 2012.

MORELI, M. L. Universidade Federal de Goiás, comunicação pessoal.

MORI, M. et al. High levels of cytokine-producing cells in the lung tissues of patients with fatal hantavirus pulmonary syndrome. **Journal Infection Diseases,** v. 179, n. 2, p. 295-302, 1999.

MORZUNOV, S.P. et al. Genetic Analysis of the Diversity and Origin of Hantaviruses in Peromyscus leucopus Mice in North America. **Journal of virology**, v. 72, n. 1, 1998.

MURANYI, W. et al. Hantavirus Infection. **Journal of the American Society of Nephrology,** v. 16, p. 3669-3679, 2005.

NETSKI, D.; THRAN, B. H.; JEOR, S. C. S. Sin Nombre Virus Pathogenesis in Peromyscus maniculatus. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, p. 585–591, 1999.

NICHOL, S.T. et al. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. **Science**, v.262, n. 5135, p.914-7, 1993.

NUNES, M. L. et al. Caracterização clínica e epidemiológica dos casos confirmados de hantavirose com local provável de infecção no bioma Cerrado Brasileiro, 1996 a 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n.4, p. 537-545, 2011.

OGINO, M. et al. Cell fusion activities of Hantaan Virus Envelope Glycoproteins.Journal of virology. **American Society for Microbiology.**, v. 78, n. 19, p. 10776-10786, 2004.

OLIVEIRA, R. C et al.. Genetic characterization of hantaviruses associated with sigmodontine rodents in an endemic area for hantavirus pulmonary syndrome in southern Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 11, n.3, p. 301-314, 2011.

PADULA, P.J. et al. Hantavirus Pulmonary Syndrome Outbreak in Argentina: Molecular Evidence for Person-to-Person Transmission of Andes Virus. **Virology**, v. 241, n.2, 1998.

PADULA, P.J. et al. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. **Journal of Medical Microbiology**, v.49, n.2, p. 149-55. 2000.

PADULA, P. J. Pathogenic aspects and protective immune response of Andes Hantavirus. **VII International Conference on HFRS, HPS and Hantavirus**. Buenos Aires Argentina, 13-15, 2007.

PETTERSSON, L. et al. Viral load and humoral immune response in association with disease severity in Puumala hantavirus-infected patients implications for treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, 2013.

PEREIRA, M. G. Estrutura vantagens e limitações dos principais métodos. In: PEREIRA, M. G. **Epidemiologia, teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.13, 289-306, 1995.

PEREIRA, G. W. et al. Prevalence of serum antibodies to hantavirus in a rural population from the southern state of Santa Catarina, Brazil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.1, p.117-119, 2012.

PINCELLI, M. P. Síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus. Síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavírus. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 29, n. 5, 2003.

PINI, N. et al. Hantavirus Infection in Humans and Rodents, Northwestern Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n. 9, p. 1070-1076, 2003.

PLYUSNIN, A., VAPALAHTI, O.; VAHERI, A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. **Journal of General Virology**, v. 77, n. 11, p. 2677-2687, 1996 (a).

PLYUSNIN, A. et al. Quasispecies in Wild-Type Tula Hantavirus Populations. **Journal of virology**, v. 70, n. 12, p. 9060–9063, 1996. (b)

PLYUSNIN, A.; MORZUNOV, S. P. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. **Current Topics in Microbiology Immunology**, v. 256, p. 47–75, 2001.

POUNDER, K. C. et al. Novel Hantavirus in Wildlife, United Kingdom. **Emerging Infections Diseases,** v. 19, n. 4, p. 673–675, 2013.

RABONI, A. 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,** v. 58, n. 1, p. 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**, v. 45, n.2, p. 153-156, 2009.

RASMUSON, J. et al. Time to revise the paradigm of hantavirus syndromes? Hantavirus pulmonary syndrome caused by European hantavirus. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n. 5, p. 685–690. 2011.

RIGO, M.M. et al. Immunogenic epitopes of Hantaviruses' N protein are restricted to conserved regions. **Frontiers in Bioscience**, v.1, n.17, p. 1582-8, 2012.

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 Disease**, v. 5, n.1, p.11-9, 2005.

ROSA, E. S. T. et al. Pygmy Rice Rat as Potential Host of Castelo dos Sonhos Hantavirus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, 2011.

ROSA, E. S. T. et al. Molecular Epidemiology of Laguna Negra Virus, Mato Grosso State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, 2012**.**

SAGGIORO, F.P. et al. Hantavirus infection induces a typical myocarditis that may be responsible for myocardial depression and shock in hantavirus pulmonary syndrome. **Journal Infection Disease,** v.195, n.10, p. 1541-9, 2007.

SANTOS, J. P.; STEINKE, E. T.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Aspectos climáticos relacionados à disseminação da hantavirose no distrito federal-brasil, 2003-2008. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde, v.**6, n.11, p.17 – 30, 2010.

SANTOS, J. P.; STEINKE, E. T.; GARCÍA-ZAPATA, M.T. Land use and occupation and hantaviruses dissemination in the São Sebastião region, Federal District: 2004 – 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n.1, p. 53-57, 2011.

SANTOS, I. O. et al. Serologic survey of hantavirus in a rural population from the northern State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**,v. 46, n.1, p.30-33, 2013.

SANTOS-JUNIOR, J. A. et al. Avaliação da reatividade cruzada ente anticorpos anti-trypanosoma cruzi e proteína N recombinante do Hantavírus Araraquara em teste imunoenzimático. In: **XLVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2011, Natal. Programa oficial do XLVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, p. 419-419, 2011.

SANTOS-JÚNIOR, J.A. **Pesquisa de anticorpos anti-hantavírus na população do Estado de Alagoas**. 118f. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL, 2012.

SCHMIDT, R. A. C. A construção do conhecimento do indivíduo no processo de sensibilização-conscientização -ação sobre a hantavirose e a oportunidade para o controle e a prevenção de zoonoses emergentes: a experiência da hantavirose em Santa Catarina/Brasil. **Saúde e Sociedade,** v,.16, n.3, p. 111-124, 2007.

SCHNEIDER, F. et al. The first French hemorrhagic fever with renal syndrome in pregnant woman. **Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction**, v.38, n.5, p.440-2, 2009.

SCHMALJOHN, C.; HJELLE, B. Hantaviruses: a global disease problem. **Emerging Infectious Disease**, v. 3, n. 2, 1997.

SESPA - Secretaria de Estado de Saúde Pública – Sespa divulga alerta sobre hantavirose para profissionais do oeste do Pará. Governo do Pará. Disponível em: <http://www.pa.gov.br/noticia_interna.asp?id_ver=115583>. Acesso em: 01 abr. 2013.

SILVEIRA, R. C., Hospital Santa Casa de Misericórdia de Passos, comunicação pessoal.

SINAN/SVS/MS. Casos confirmados de hantavirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1993 a 2013. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jun/21/ANEXOHANTA(2).pdf>.

SINAN/SVS/MS. Óbitos de Hantavirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1993 - 2013. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jun/21/ANEXOHANTA>.

SHOUNTZ, T. et al. Regulatory T cell-like responses in deer mice persistently infected with Sin Nombre virus. **Proceeding of the National Academy of Science,** v. 104, n, 39, p.15496-15501, 2007.

SMADEL, J. Epidemic hemorrhagic fevers. **American Journal of Public Health**, v.43, p.1327- 1330, 1953.

SMARH – **Plano estadual de recursos hídricos do estado de Alagoas. Etapa A – Coleta de dados e programa executiva.** Proágua. Secretária do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos (SMARH). Governo do Estado de Alagoas, v. 1, 162p. Maceió, Alagoas, 2009.

SOBREIRA, M. et al. A serosurvay for hantavirus infection in wild rodents from the states of Rio de Janeiro and Pernambuco, Brazil. **Acta Tropica**, v. 107, n.2, p. 150-152. 2008.

SOUZA, W. M. et al. Serosurvey of hantavírus infection in human n the border region between Brazil and Argentina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n.2, p.131-135, 2011.

SOUZA, W. M. et al. Antibody levels to hantavirus in inhabitants of western Santa Catarina State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.54, n.4, 2012.

SUZUKI, A. et al. Identifying Rodent Hantavirus Reservoirs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, 2004.

TARUISHI, M. et al. Lack of vertical transmission of Hantaan virus from persistently infected dam to progeny in laboratory mice. **Archives of Virology**, v.153, n.8, p. 1605-9, 2008.

TISCHLER, N.D. et al. Complete sequence of the genome of the human isolate of Andes virus CHI-7913: comparative sequence and protein structure analysis. **Biological Research**., v.36, n. 2, p.201-210, 2003.

TORO, J. et al. An Outbreak of Hantavirus Pulmonary Syndrome, Chile, 1997**. Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, 1998.

TRAVASSO DA ROSA, E. S. et al. Newly recognizaed hantaviruses associated with hanttavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic caracterization of hantavirus and sololological implications of likely reservoirs. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 5, n.1, p. 11-19, 2005.

UMENAI, T. et al. Korean haemorrhagic fever in staff in an animal laboratory. **The Lancet**, v.1, n.8130, p.1314-6, 1979.

VAHERI, A.; VAPALAHTI, O.; PLYUSNIN, A. How to diagnose hantavirus infections and detect them in rodents and insectivores. **Reviews in Medical Virology, v.** 18, n.4, p.277-88, 2008.

VALDIVIESO, F. et al. Neutralizing antibodies in survivors of Sin Nombre and Andes hantavirus infection. **Emerging Infectious Disease, v.**12, n. 1, p.166-8, 2006.

VIRTANEN, J. O. et al. Tula hantavirus NSs protein accumulates in the perinuclear area in infected and transfected cells. **Archives of Virology**, v. 155, n. 1, p. 117–121. 2010.

VITEK, C.R. et al.Evidence against infection with hantaviruses among forest and park workers in the southwestern United States. **The Journal Infectious Diseases**, v.23, p.283-285, 1996.

YE, C. et al. Neutralizing antibodies and Sin Nombre virus RNA after recovery from Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. **Emerging Infectious Disease**, v.10, n. 3, p. 478-481, 2004.

WANG, H. et al. Interaction between hantaviral nucleocapsid protein and the cytoplasmic tail of surface glycoprotein Gn. **Virus Research**, v. 151, n. 205-212, 2010.

WEISS, S. et al. Hantavirus in Bat, Sierra Leone**. Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n.1, p. 159-161, 2012.

WELLINGHAUSEN, N.; GOETZ, A.; WEBER, U. Occurrence of immunologlobulin M antibodies against several bacterial and viral pathogens in acute Hantavirus infection. **Clinical and vaccine immunology**, v. 19, n. 9, p.1549-1551. 2012.

WELLS, R.M. et al. An unusual outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus pulmonary syndrome study goup for Patagonia. **Emerging Infectious Disease**, v.3, n.2, p.171-174, 1997.

WERNLY, J. A. et al. Extracorporeal membrane oxygenation support improves survival of patients with Hantavirus cardiopulmonary syndrome refractory to medical treatment. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, N. 40, p.1334-1340, 2011.

WOO, G. J. et al. Analysis of immune responses against nucleocapsid protein of the Hantaan virus elicited by virus infection or DNA vaccination. **Journal Microbiology**, v.43, n.6, p.537-45, 2005.

ZAKI, S.R. et al. Hantavirus pulmonary syndrome: Pathogenesis of an emerging infectious disease. **American Journal Pathology**, v.146, p.552-579, 1995.

ZHANG, Y. et al. Hantavirus outbreak associated with laboratory rats in Yunnan, China. **Infection, Genetics and Evolution**, v.10,p. 638–644, 2010.

ZHU, L. Y. et al. Reduced circulating CD4+CD25+ cell populations in haemorrhagic fever with renal syndrome. Clinical Experimental Immunology, v.156, n. 1, p. 88-96. 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (adulto).

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)

(Em 2 vias, firmado por cada participante-voluntári(o,a) da pesquisa e pelo responsável)

> **"*O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.*"** (Resolução. nº 196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde)

Eu, ..., tendo sido convidad(o,a) a participar como voluntári(o,a) da pesquisa: **"Pesquisa Diagnóstica de Casos de Hantavirose e Estudo da Resposta Imune dos Indivíduos com Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavírus"** recebi da Sr(a). Profa Dra Alessandra Abel Borges, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a realizar uma pesquisa de anticorpos contra o micróbio (vírus) causador da doença pesquisada (Hantavirose).
- Que a importância deste estudo é a de saber se existe a presença desse micróbio causando doença em Alagoas.
- Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: levar ao conhecimento dos profissionais da saúde e pesquisadores sobre a existência desse micróbio ou de pessoas que já foram infectadas por ele em Alagoas.
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: amostra de sangue será coletada pelos integrantes da pesquisa e será analisada no laboratório LAPEVI, no ICBS/UFAL e os dados coletados serão analisados pelos pesquisadores.
- Que eu participarei das seguintes etapas: na autorização aos pesquisadores em coletar e analisar o meu sangue, além de autorizar a análise dos meus dados pessoais e clínicos.
- Que os outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados são as seguintes: atualmente não existe os outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados em Alagoas.
- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: pequena dor ou incômodo no local onde o sangue será coletado.
- Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental são: a participação no estudo não trará nenhum risco à minha saúde física ou mental.
- Que deverei contar com a seguinte assistência: contarei na ocasião da coleta, que será realizada por profissionais da saúde devidamente qualificados, com informações sobre maneiras de prevenir a doença do estudo, além de informações sobre o resultado do meu exame, sendo responsável(is) pela pesquisa: Dra. Alessandra Abel Borges, do ICBS-UFAL.

- Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: conhecer se essa doença pesquisada existe em Alagoas e se já fui infectado por esse micróbio (vírus).
- Que a minha participação será acompanhada do seguinte modo: a minha participação na pesquisa será acompanhada durante o momento da coleta e da entrevista ou através de um posterior contato pelos pesquisadores. Que, sempre que desejar será fornecido esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.
- Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.
-

Endereço d(o,a) participante-voluntári(o,a)
Domicílio: (rua, praça, conjunto):
Bloco: /Nº: /Complemento:
Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:
Ponto de referência:

Endereço d(os,as) responsáve(l,is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):
Instituição: Universidade Federal de Alagoas – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Endereço Praça Afrânio Jorges s/n
Bloco: /Nº: /Complemento: Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia - LAPEVI
Bairro: /CEP/Cidade: Prado / 57010-020 / Maceió
Telefones p/contato: 3336-3444 ramal 223; 9973-7981

Maceió,

(Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) ou resposável legal - Rubricar as demais folhas)	Nome e Assinatura do(s) responsável(eis) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (menor de idade).

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)

(Em 2 vias, firmado por cada participante-voluntári(o,a) da pesquisa e pelo responsável)

> **"*O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.*"** (Resolução. nº 196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde)

Eu, ..., responsável, por .....tendo sido convidad(o,a) a participar como voluntári(o,a) da pesquisa: **"Pesquisa Diagnóstica de Casos de Hantavirose e Estudo da Resposta Imune dos Indivíduos com Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavírus"** recebi da Sr(a). Profa Dra Alessandra Abel Borges, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a realizar uma pesquisa de anticorpos contra o micróbio (vírus) causador da doença pesquisada (Hantavirose).
- Que a importância deste estudo é a de saber se existe a presença desse micróbio causando doença em Alagoas.
- Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: levar ao conhecimento dos profissionais da saúde e pesquisadores sobre a existência desse micróbio ou de pessoas que já foram infectadas por ele em Alagoas.
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: amostra de sangue será coletada pelos integrantes da pesquisa e será analisada no laboratório LAPEVI, no ICBS/UFAL e os dados coletados serão analisados pelos pesquisadores.
- Que eu participarei das seguintes etapas: na autorização aos pesquisadores em coletar e analisar o meu sangue, além de autorizar a análise dos meus dados pessoais e clínicos.
- Que os outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados são as seguintes: atualmente não existe os outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados em Alagoas.
- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: pequena dor ou incômodo no local onde o sangue será coletado.
- Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental são: a participação no estudo não trará nenhum risco à minha saúde física ou mental.
- Que deverei contar com a seguinte assistência: contarei na ocasião da coleta, que será realizada por profissionais da saúde devidamente qualificados, com informações sobre maneiras de prevenir a doença do estudo, além de informações sobre o resultado do meu exame, sendo responsável(is) pela pesquisa: Dra. Alessandra Abel Borges, do ICBS-UFAL.

- Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: conhecer se essa doença pesquisada existe em Alagoas e se já fui infectado por esse micróbio (vírus).
- Que a minha participação será acompanhada do seguinte modo: a minha participação na pesquisa será acompanhada durante o momento da coleta e da entrevista ou através de um posterior contato pelos pesquisadores. Que, sempre que desejar será fornecido esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.
- Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.
-

Endereço d(o,a) participante-voluntári(o,a)
Domicílio: (rua, praça, conjunto):
Bloco: /Nº: /Complemento:
Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:
Ponto de referência:

Endereço d(os,as) responsáve(l,is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):
Instituição: Universidade Federal de Alagoas – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Endereço Praça Afrânio Jorges s/n
Bloco: /Nº: /Complemento: Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia - LAPEVI
Bairro: /CEP/Cidade: Prado / 57010-020 / Maceió
Telefones p/contato: 3336-3444 ramal 223; 9973-7981

Maceió,

(Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) ou resposável legal - Rubricar as demais folhas)	Nome e Assinatura do(s) responsável(eis) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)

APÊNDICE C - Ficha de Busca para Inquérito Sorológico para Hantavirose.

FICHA DE BUSCA INQUÉRITO SOROLÓGICO PARA HANTAVÍRUS registro Lapevi nº P_____

Nome:_____ _____

Idade:_____ Sexo: M ( ) F ( )

Profissão/ocupação:_____

Procedência/naturalidade:_____

OBS:_____

Endereço:_____

_____Município:_____Zona urbana( ) Zona rural ( )

_____

Telefone:_____ Escolaridade_____ _____

1) Já trabalhou em usina ou em canaviais ou na agricultura em outros locais?

( ) não
( ) sim, em outros municípios de Alagoas. Quais?_____
( ) sim, em outros Estados: (anotar o estado e os municípios trabalhados)_____
_____
_____

2) Já teve alguma doença em que sentiu falta de ar, acompanhada de febre e dor no corpo?

( ) não
( ) sim, recentemente
( ) sim, muito tempo atrás

3) Já morou fora do estado de Alagoas? Onde?

_____

_____

_____

4) Tem alguma doença crônica (doença de Chagas, leishmaniose ou calazar, esquistossomose ou barriga d'água)?

( ) não

( ) sim. Qual?_____

5) Costuma ter contato com ratos?

( ) não

( ) sim, raramente

( ) sim, frequentemente

6) Como é este contato com ratos? (pode marcar mais de uma alternativa)
( ) apenas viu o rato ou suas fezes
( ) apenas sentiu o cheiro da urina do rato
( ) matou o rato. Como?_____
( ) foi mordido por rato
( ) outro. Explique_____

ANEXO

ANEXO A – Soluções

- Tampão carbonato-bicarbonato (pH: 9,6):

Estoque:

- Na_2CO_3 (0,2M) (1L): 21, 198g (solução A)

-$NaHCO_3$ (0,2M) (1L): 16,8014g (solução B)

Uso (0,5L):

40mL de solução A + 85mL de solução B + 375mL H_2O destilada

- Tampão fosfato-alcalino (PBS 10x; 1L) (pH: 7,3-7,4)

-NaCl: 80g

-KCl: 2g

-Na_2HPO_4 (anidro): 11,5g

ou

-Na_2HPO_4. H_2O: 13,82g

-KH_2PO_4: 2g

Solução de uso:

- PBS 1x (100ml PBS 10x + 900ml água destilada)

- Solução de lavagem (PBS-T) (1L)

PBS 1x + 1mL de Tween 20

- Solução de bloqueio (PBS-T com 10% de LPD)

Leite em pó desnatado (LPD): 10g

PBS 1x: 100ml