



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PATOLOGIA DAS DOENÇAS TROPICAIS

DARLENE DE BRITO SIMITH

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA PARCIAL E COMPLETA DA NUCLEOPROTEÍNA
DE HANTAVÍRUS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Belém-Pará

2011

DARLENE DE BRITO SIMITH

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA PARCIAL E COMPLETA DA NUCLEOPROTEÍNA
DE HANTAVÍRUS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada à aprovação como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da UFPA.

Orientador: Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes

Belém-Pará

2011

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)-
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical.**

Simith, Darlene de Brito

Caracterização genética parcial e completa da nucleoproteína de hantavírus na Amazônia brasileira / Darlene de Brito Simith; orientador, Márcio Roberto Teixeira Nunes. - 2011.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2011.

1. Hantavírus – Amazônia brasileira. I. Nunes, Márcio Roberto Teixeira, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 576.6484

Ficha catalográfica elaborada por Valdenira de Jesus NMT/UFPA

DARLENE DE BRITO SIMITH

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA PARCIAL E COMPLETA DA NUCLEOPROTEÍNA
DE HANTAVÍRUS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada à aprovação como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, pela Comissão formada pelos professores:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes
Orientador - IEC

Profa. Dra. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa
Avaliador - IEC

Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
Avaliador - IEC

Profa. Dra. Rita Catarina Medeiros de Sousa
Avaliador – NMT/UFPA

Profa. Dra. Daniele Barbosa de Almeida Medeiros
Suplente – IEC

Belém - Pará

2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família pela motivação e suporte a que me dedicam desde que nasci, pelo carinho e compreensão nas horas difíceis e acima de tudo, pelos esforços no sentido de me proporcionar sempre a melhor educação, essencial à minha formação acadêmica da qual tenho muito orgulho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, força e fé que me guiam todos os dias.

Aos meus pais e irmão, sem os quais jamais teria conseguido chegar neste caminho, pois sempre me deram suporte para seguir em frente.

Ao Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes, pela orientação nas etapas fundamentais para o andamento deste trabalho.

As colegas de trabalho Dra. Daniele Barbosa de Almeida Medeiros e Dra. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa, grandes amigas, que sempre me ajudaram desde que eu era uma estagiária e me ensinaram tudo o que sei.

A Universidade Federal do Pará/UFPA e ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Medicina Tropical, pela oportunidade em me especializar na área de Patologia das Doenças Tropicais.

Aos amigos especiais que entenderam quando eu não podia sair para terminar meu trabalho e que me apoiaram e torceram por mim durante toda esta jornada.

Ao Instituto Evandro Chagas, instituição que me acolheu como estagiária desde a época da minha graduação.

Ao chefe da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas, Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, por ter permitido o meu crescimento profissional dentro desta Seção.

Aos colegas de trabalho e amigos da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, que foram meus companheiros de batalha e de laboratório

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o planejamento, execução e conclusão dessa dissertação.

A persistência é o caminho do êxito.
Charles Chaplin.

RESUMO

A Síndrome Pulmonar por Hantavírus (SPH) vem sendo diagnosticada na Amazônia brasileira desde 1995. Até dezembro de 2010 já foram diagnosticados 289 casos na Amazônia brasileira, registrados nos estados do Mato Grosso, Pará, Maranhão, Amazonas e Rondônia. O objetivo geral do presente estudo foi caracterizar geneticamente cepas de hantavirus circulantes nesses estados. Foram utilizadas amostras de vísceras de roedores silvestres positivos para anticorpos IgG contra hantavírus, capturados em estudos ecoepidemiológicos, realizados nos municípios de Itacoatiara/AM, Alto Paraíso/RO e Campo Novo do Parecis/MT, e soro/sangue de casos humanos de SPH provenientes dos municípios da área de influência da BR-163, nos estados do Pará e Mato Grosso, Tomé-Açu/PA, Tangará da Serra/MT, além de *pool* de vísceras de um óbito procedente de Anajatuba/MA. As amostras foram submetidas à extração de RNA viral, seguida das reações de RT-Hemi-Nested-PCR para amostras de roedores, RT-Nested-PCR para amostras de humanos e sequenciamento nucleotídico, utilizando o método de Sanger e o pirosequenciamento, sendo, posteriormente, verificados quanto a aspectos como, identidade (BLAST search), similaridade (SimPlot) e homologia nucleotídica e aminoacídica com outros hantavírus (Clustal W). Foram obtidas as sequências parciais dos hantavírus em cinco roedores da espécie *Oligoryzomys microtis* (n=2 de Itacoatiara/AM; n=3 de Alto Paraíso/RO) e em oito amostras de humanos (n=1 de Tomé-Açu/PA; n=1 de Altamira/Cachoeira da Serra; n=1 de Novo Progresso/PA; n=1 de Garantã do Norte/MT; n=1 de Anajatuba/MA e n=3 de Altamira/Castelo dos Sonhos). Com a utilização da estratégia do pirosequenciamento foram obtidas as sequências completas do gene N, S-RNA dos hantavírus em três roedores (n=2 de Alto Paraíso/RO e n=1 de Campo Novo do Parecis/MT) e dois casos humanos (n=1 de Tangará da Serra/MT e n=1 de Novo Progresso/PA). As análises das sequências completas demonstraram a presença de ORFs para uma possível proteína NSs, já descrita para outros hantavírus. As análises filogenéticas entre as sequências obtidas neste estudo e de outros hantavírus disponíveis no GenBank sugerem que, o vírus *Castelo dos Sonhos* é o responsável pelos casos de SPH em municípios da área de influência da BR-163, obtendo-se, pela primeira vez, a sequência completa desse vírus em roedor *Oligoryzomys utiaritensis*, capturado no Mato Grosso; confirmou-se a circulação contínua do vírus *Laguna Negra*-like, associado aos casos de SPH no estado do Mato Grosso; o vírus *Mamoré*-like foi detectado pela primeira vez em roedores *O. microtis*, nos estado do Amazonas e Rondônia, porém não associado a casos humanos; o vírus *Anajatuba* foi o responsável por um caso de óbito proveniente do Maranhão. Esse trabalho servirá como suporte para estudos moleculares e epidemiológicos futuros, pois, fornece dados inéditos acerca da transmissão das hantavirose na Amazônia brasileira.

Palavras Chaves: hantavírus, Amazônia brasileira, análises filogenéticas

ABSTRACT

The Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) has been diagnosed in the Brazilian Amazon since 1995. Until december 2010 have been diagnosed 289 cases in the Brazilian Amazon, registered in the states of Mato Grosso, Pará, Maranhão, Amazonas and Rondônia. The overall objective of this study was to characterize genetically hantavirus strains circulating in these states. Samples of viscera from wild rodents positive for IgG antibodies against hantavirus caught in ecoepidemiológicos studies, conducted in the municipalities of Itacoatiara/AM, Alto Paraíso/RO and Campo Novo do Parecis/MT, and serum/blood of human cases of HPS from the municipalities in the area of influence of BR-163 in the states of Pará and Mato Grosso, Tomé-Açu/PA, Tangará da Serra/MT, and viscera of a pool of death coming from Anajatuba/MA. The samples were extracted viral RNA, followed by the reactions of RT-Hemi-Nested-PCR for samples from rodents, RT-Nested-PCR for human samples and nucleotide sequencing using the Sanger method and pyrosequencing, and later, scanned for matters such as identity (BLAST search), similarity (Simplot) and nucleotide and aminoacidic homology with other hantaviruses (Clustal W). We obtained partial sequences of hantavirus in five species of rodents *Oligoryzomys microtis* (n=2 from Itacoatiara/AM; n=3 from Alto Paraíso/RO) and in eight samples from humans (n=1 from Tomé-Açu/PA; n=1 from Altamira/Cachoeira da Serra; n=1 from Novo Progresso/PA; n=1 from Guarantã do Norte/MT; n=1 de Anajatuba/MA and n=3 de Altamira/Castelo dos Sonhos). Using the strategy of pyrosequencing were obtained complete sequences of the gene N, S-RNA of three hantavirus in rodents (n=2 from Alto Paraíso/RO and n=1 from Campo Novo do Parecis/MT) and two human cases (n=1 from Tangará da Serra/MT and n=1 from Novo Progresso/PA). Analysis of complete sequences showed the presence of ORFs for possible NSs protein, as described for other hantaviruses. Phylogenetic analysis of the sequences obtained in this study and other hantaviruses available in GenBank suggests that the virus *Castelo dos Sonhos* is responsible for cases of HPS in municipalities in the area of influence of BR-163, obtaining for the first time, the complete sequence of this virus in rodent *Oligoryzomys utiaritensis*, coming from Mato Grosso; confirmed the continued circulation of Laguna Negra-like virus associated with HPS cases in the state of Mato Grosso; the *Rio Mamoré*-like virus was first time detected in *O. microtis* rodents, the state of Amazonas and Rondônia, but not associated with human cases; the virus *Anajatuba* was responsible for a case of death from Maranhão. This work will serve as support for future epidemiological and molecular studies, therefore, provides new data about the spread of hantaviruses in the Brazilian Amazon.

Key-Words: hantavirus, brasilian Amazon, phylogenetic analysis.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Distribuição dos casos de SPH ocorridos no Brasil, de 1993 até dezembro de 2010. Somam-se ainda 22 casos de procedência indeterminada e/ou ignorada.	18
Figura 2 - A figura 2A mostra a microscopia eletrônica evidenciando partículas virais esféricas em brotamento, enquanto a figura 2B representa esquematicamente a estrutura da partícula viral de um membro da família <i>Bunyaviridae</i> , da qual pertence o gênero hantavírus, mostrando as glicoproteínas Gn e Gc. A figura 2C evidencia os três nucleocapsídeos helicoidais circulares, compreendendo cada um dos segmentos de RNA (segmentos S, M e L).	21
Figura 3 - Os três segmentos de RNA que compõem o genoma dos hantavírus representados em detalhes, juntamente a seus produtos de codificação.	22
Figura 4 - Distribuição geográfica dos hantavírus nas Américas.	31
Figura 5 - Árvore filogenética mostrando a co-evolução entre hantavírus e seus respectivos roedores reservatórios.	33
Figura 6 - Mapa da região Amazônica evidenciando os estados do Pará (PA) e Mato Grosso (MT) e mostrando a rodovia BR-316, a qual conecta os municípios de Santarém, no Pará, com Cuiabá, a capital do MT.	37
Figura 7 - Mapa mostrando a localização do município Alto Paraíso, no estado de Rondônia, ligado à capital Porto velho pela Rodovia BR-364.	38
Figura 8 - Mapa mostrando a localização do município de Itacoatiara, no estado do Amazonas, ligado à Manaus pela rodovia AM - 010.	39
Figura 9 - Mapa mostrando a localização dos municípios de Campo Novo do Parecis e Tangará da Serra, no estado do Mato Grosso, ao longo da Rodovia BR -364 (linha amarela).	40
Figura 10 - Município de Tomé-Açu, localizado no estado do Pará, distante 113 km da capital Belém.	41
Figura 11 - Município de Anajatuba, no estado do Maranhão.	42

Figura 12 - Resumo ilustrativo do sequenciamento de DNA na plataforma do GFS FLX Genome Sequencer 454: a) preparação das bibliotecas; b) PCR em emulsão e c) sequenciamento.	52
Figura 13 - Árvore filogenética construída pelo método da máxima verossimilhança pelo programa PHYML, a partir de sequências parciais das amostras em estudo e demais hantavírus disponíveis no GenBank.	63
Figura 14 - Análise filogenética das sequências completas do segmento S, gene N dos hantavírus procedentes dos Estados do Mato Grosso, Rondônia e Pará obtidas no presente estudo (em vermelho).	68
Figura 15 - Análise de similaridade utilizando o programa SimPlot versão 3.5.1 tendo como padrão de referência AN717313.	72
Figura 16 - Análise de similaridade utilizando o programa SimPlot versão 3.5.1 utilizando como referência a amostra AN731172, procedente de Tangará da Serra, Mato Grosso, comparada ao VSN, VARA, VAND, VJUQ, VMAP, VRIOM e VLN.	73
Figura 17 - Análise de similaridade utilizando o programa SimPlot versão 3.5.1 utilizando como referência a amostra de roedor AN693269, procedente de Alto Paraíso, Rondônia, comparada com o VSN, VARA, VAND, VMAP, VLN, VRIOM e a amostra de mesma procedência AN693292, com a qual mostrou maior similaridade.	74
Figura 18 - Análise de similaridade baseada nas sequências parciais dos hantavirus do Amazonas e Rondônia.	75

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	08
1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4 REVISÃO DA LITERATURA	16
4.1 HISTÓRICO DAS HANTAVIROSES	18
4.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA SPH	19
4.3 ASPECTOS VIROLÓGICOS	20
4.3.1 Taxonomia	20
4.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURA GENÔMICA.....	20
4.5 REPLICAÇÃO VIRAL	23
4.6 ECOEPIDEMIOLOGIA	24
4.6.1 Dinâmica da Infecção	24
4.6.2 Distribuição Geográfica dos hantavírus e Hospedeiros	28
4.7 FILOGENIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DOS HANTAVÍRUS	32
4.8 PREVENÇÃO E CONTROLE	34
5 MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS DO ESTUDO	36
5.1.1 Área de influência da Rodovia BR-163	36
5.1.2 Município de Alto Paraíso, Rondônia	37
5.1.3 Município de Itacoatiara, Amazonas	38
5.1.4 Campo Novo do Parecis e Tangará da Serra, Mato Grosso	39
5.1.5 Município de Tomé-Açú, Pará	40
5.1.6 Município de Anajatuba, Maranhão	41
5.2 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS PARA AS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR	42
5.2.1 Amostras de Roedores	42

5.2.2	Amostras de Humanos	45
5.3	DETECÇÃO PARCIAL DO GENOMA VIRAL	46
5.4	SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO PARCIAL	48
5.4.1	Método de Sanger	49
5.5	SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO COMPLETO DO GENE N, S-RNA POR PIROSEQUENCIAMENTO.....	50
5.6	ANÁLISE FILOGENÉTICA	53
5.7	DETERMINAÇÃO E ANÁLISE DE SIMILARIDADE (BOOTSCANNING) DAS REGIÕES CODIFICANTES	56
6	RESULTADOS	57
6.1	DETECÇÃO PARCIAL DO GENOMA DE HANTAVÍRUS	57
6.2	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS	58
6.2.1	Sequências Parciais, gene N, S-RNA	58
6.2.2	Sequências completas, gene N, S-RNA	59
6.3	ANÁLISE FILOGENÉTICA	60
6.3.1	Sequências Parciais	61
6.3.2	Sequências completas do Gene N	66
6.4	RESULTADOS DA ANÁLISE DE SIMILARIDADE – SIMPLOT	71
7	DISCUSSÃO	76
8	CONCLUSÕES	89
9	REFERÊNCIAS	90
ANEXO 1	104
ANEXO 2	105

1 INTRODUÇÃO

As hantavirose encontram-se amplamente distribuídas por quase todos os continentes, exceto na Oceania e Antártica. A doença apresenta-se sob duas formas clínicas distintas: a Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR), que ocorre na Ásia, África e Europa, e a Síndrome Pulmonar por Hantavírus (SPH), doença emergente nas Américas (KLEMPA et al., 2006; 2010).

Os agentes etiológicos das hantavirose são os hantavírus, membros do gênero *Hantavirus*, que, juntamente com outros quatro gêneros (*Orthobunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*) constituem a família *Bunyaviridae*, uma das maiores famílias virais, com cerca de 300 vírus, dentre tipos, subtipos e espécies virais (KARABATSOS, 1985; SCHMALJOHN, 1996; MERTZ, 1997; ICTV, 2005)

Os hantavírus infectam o homem através de aerossóis de excretas contaminadas de roedores pertencentes à família Cricetidae e Muridae, seus hospedeiros naturais no Novo e Velho Mundos, respectivamente. (KARABATSOS, 1985; EISENBERG E REDFORD, 1999; MERTZ, 1997; SCHMALJOHN, 1996; SCHMALJOHN E HJELLE, 1997)

O diagnóstico das hantavirose é comumente realizado pela técnica de *Enzyme - Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para detecção de anticorpos específicos da classe IgG e IgM em amostras de soro ou sangue de pacientes suspeitos de infecção por hantavírus. Outros testes podem também ser realizados como, a imunofluorescência indireta (IFI). A técnica de Imunohistoquímica pode ser utilizada para detecção de antígeno em casos de óbito. Em inquéritos eco-epidemiológicos para captura e coleta de sangue e vísceras de roedores para investigação da taxa de infecção utiliza-se o ELISA para detecção apenas de anticorpos IgG no sangue desses animais (LEE, 1988; TSAI, 1987; ZÖLLER et al., 1993; ZAKI et al., 1995; PADULA et al., 2000).

O isolamento viral é realizado através da inoculação de suspensão de fragmentos de vísceras de roedores e de humanos necropsiados em cultura de células VERO E6 (rim de macaco verde africano), A-549 (linhagem celular de carcinoma de pulmão humano) e cultura primária de pulmão de rato, porém a infecção produz pouco ou nenhum efeito citopático, mas é detectada por IF (TSAI, 1987).

A inoculação em animais de laboratório requer que todas as práticas laboratoriais sejam realizadas dentro dos padrões correspondentes ao nível de Biossegurança 4 (NB4) (OPS, 1999; CDC, 2002).

A transcrição reversa, seguida da Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) e do sequenciamento nucleotídico são técnicas complementares à sorologia e tem-se mostrado eficientes para detecção de RNA viral e caracterização genética dos hantavírus, respectivamente (LE GUENNO, 1993; KIM et al. 1994; MORELI, MORO DE SOUSA, FIGUEIREDO, 2004).

Outra técnica laboratorial utilizada é a RT-PCR em tempo-real (*Real-Time* RT-PCR), cuja vantagem está na rapidez de obtenção dos resultados (o tempo gasto para o diagnóstico é clinicamente relevante), minimização das contaminações e a possibilidade de controlar em tempo real o desempenho do ensaio, sendo extremamente útil para o estudo dos agentes virais e contribui para esclarecer processos de doença infecciosa, além de poder quantificar o ácido nucléico-alvo (RT-PCR Quantitativo em tempo-real - qPCR) (TERAJIMA et al., 1999; MACKAY et al., 2002; AITICHOU et al., 2005; KRAMSKI et al., 2007).

2 JUSTIFICATIVA

Ao contrário do que ocorre nas demais regiões brasileiras, a identificação de hantavírus na região Amazônica, bem como o diagnóstico pelas técnicas sorológicas (ELISA) e moleculares (RT-PCR), encontra dificuldades, reflexo da maior diversidade de espécies virais nessa região. Apesar disto, a identificação das diferentes espécies na Amazônia brasileira (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2005; TRAVASSOS DA ROSA, 2008; RABONI et al., 2009; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2010), bem como de outras já registradas na América do Sul tem crescido, porém existem estados onde a espécie responsável pelas infecções ainda permanece desconhecida, como ocorre no Amazonas e Rondônia, cujos primeiros casos foram notificados no ano de 2004 e ainda estão em plena expansão de suas fronteiras agrícolas para a produção de grãos, atividade que atrai os roedores reservatórios para as habitações humanas. Além disso, torna-se necessário o mapeamento completo dos vírus circulantes na região amazônica para complementar os estudos sobre os hantavírus brasileiros.

A identificação das espécies virais circulantes no país e dos seus respectivos reservatórios naturais fornecerão subsídios para o entendimento da epidemiologia molecular dos hantavírus, bem como da associação destes agentes virais com a doença em humanos. Desta forma, este projeto visa identificar hantavírus por técnicas de biologia molecular em espécimes biológicos de roedores silvestres capturados em Rondônia, Amazonas e Mato Grosso e de casos humanos procedentes do Pará, Mato Grosso e Maranhão, estados que fazem parte da área de abrangência do laboratório de hantaviruses do Instituto Evandro Chagas (IEC): Amazonas, Rondônia, Mato Grosso, Maranhão e Pará.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização genética de hantavírus circulantes em estados da Amazônia brasileira.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o genoma viral pela técnica de RT-Hemi-Nested-PCR em amostras biológicas de roedores silvestres e RT-Nested-PCR em amostras humanas sorologicamente positivas, provenientes dos estados da Amazônia brasileira;
- Identificar as espécies de hantavírus através do sequenciamento parcial do gene N, segmento S, a partir dos produtos da RT-Nested-PCR obtidos;
- Obter sequências completas do gene N, segmento S-RNA dos hantavírus amazônicos, através do pirosequenciamento;
- Observar o grau de homologia das sequências obtidas com outras sequências de hantavírus sul americanos;
- Realizar a análise filogenética, comparando as sequências obtidas com as sequências de outros hantavírus disponíveis no GenBank;

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 HISTÓRICO DAS HANTAVIROSES

A hantavirose foi originalmente descrita em 1913, na União Soviética, Coréia e China e em 1934, na Escandinávia e Leste Europeu, como um complexo de doenças infecciosas agudas, caracterizadas por disfunção renal e manifestações hemorrágicas. Em 1951, durante a Guerra da Coréia, 3000 soldados foram vitimados pela FHSR (conhecida por Febre Hemorrágica da Coréia naquele país), posteriormente associada ao *vírus Hantaan* (VHTN), protótipo do gênero, cujo isolamento somente ocorreu em 1976 por LEE e LEE (1976) a partir do tecido pulmonar de roedor silvestre da espécie *Apodemus agrarius coreae*, capturado às margens do rio Han, região rural da Coréia. Esse isolamento viral possibilitou um grande avanço no estudo dos hantavírus (LEE E LEE, 1976; 1977; 1978; IVERSSON, 1996; LOPES, 2004).

Posteriormente foi descoberto o agente etiológico da forma europeia de FHSR, a nefropatia epidêmica, conhecido como *vírus Puumala* (VPUU) (BRUMMER-KORVENKONTIO et al., 1980) e também do *vírus Seoul* (VSEO) transmitido pelos ratos urbanos da espécie *Rattus rattus* (rato do telhado) e *Rattus norvegicus* (ratazana) (LEE, 1988).

Em junho de 1993, na região sudoeste dos Estados Unidos, um novo hantavírus foi responsável por casos de doença respiratória grave com alta letalidade, representando a primeira emergência da SPH no mundo (CHILDS et al., 1994), sendo este agente inicialmente denominado de *vírus Four Corners* (HJELLE et al., 1994), foi renomeado para *vírus Muerto Canyon* (ELLIOTT et al., 1994) e, finalmente, para *vírus Sin Nombre* (VSN), disseminando-se, posteriormente, a outros estados americanos (NICHOL et al., 1993; CHIZHIKOV et al., 1995).

A partir de 1995 outros hantavírus relacionados com SPH foram detectados nos Estados Unidos, associados a casos esporádicos da doença, como o *vírus Bayou* (VBAY) (MORZUNOV et al., 1995), relacionado ao roedor *Oryzomys palustris*, o *vírus Black Creek Canal* (VBCC) (ROLLIN et al., 1995), associado ao *Sigmodon hispidus* e o *vírus New York* (VNY), associado ao *Peromyscus leucopus*. Em fevereiro de 1995, foram diagnosticados, nos Estados Unidos, 103 casos da SPH, dos quais 40% evoluíram a óbito (IVERSSON, 1996).

No Brasil, entre novembro e dezembro de 1993, três casos da SPH foram diagnosticados na área rural de Juquitiba, estado de São Paulo, constituindo o primeiro registro clínico da SPH no Brasil (IVERSSON et al., 1994; SILVA et al., 1997; VASCONCELOS et al., 1997). Foi identificado como agente etiológico desses casos, o *vírus* Juquitiba (VJUQ). Outros genótipos brasileiros foram posteriormente identificados: o *vírus* Castelo dos Sonhos (VCAS), no estado do Pará e o *vírus* Araraquara (VARA) no estado de São Paulo, associados a casos fatais de SPH ocorridos em 1995 e 1996, respectivamente. (JOHNSON et al., 1999).

A SPH passou a ser reconhecida em outros países e possibilitou o isolamento de novas espécies de hantavírus, que se encontram, hoje, amplamente distribuídas nas Américas. Após a descrição de importante comprometimento cardíaco, a partir da publicação dos primeiros casos da América do Sul, a SPH tem sido descrita no Brasil como Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavírus (SPCVH) (IVERSSON et al., 1994; HINRICHSEN e GODOI, 1996; JOHNSON et al., 1997; LÓPEZ, 1997; TORO et al., 1998; OPS, 1999; FIGUEIREDO et al., 2001; FERREIRA, 2003; SAGGIORO et al., 2007).

No ano de 2000 registrou-se o primeiro surto de SPH na Amazônia brasileira, nas localidades de Quebra e São Jerônimo, área rural de Anajatuba, município do estado do Maranhão (MENDES et al., 2001). Um estudo ecoepidemiológico com roedores na região proporcionou a identificação de dois novos hantavírus, o *vírus* Anajatuba (VANAJ) e o *vírus* Rio Mearim (VRIME), cujos reservatórios naturais descritos foram os roedores *Oligoryzomys fornesi* e *Holochilus sciureus*, respectivamente (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2005), havendo posteriormente, a comprovação de associação do VANAJ com os casos humanos (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2010).

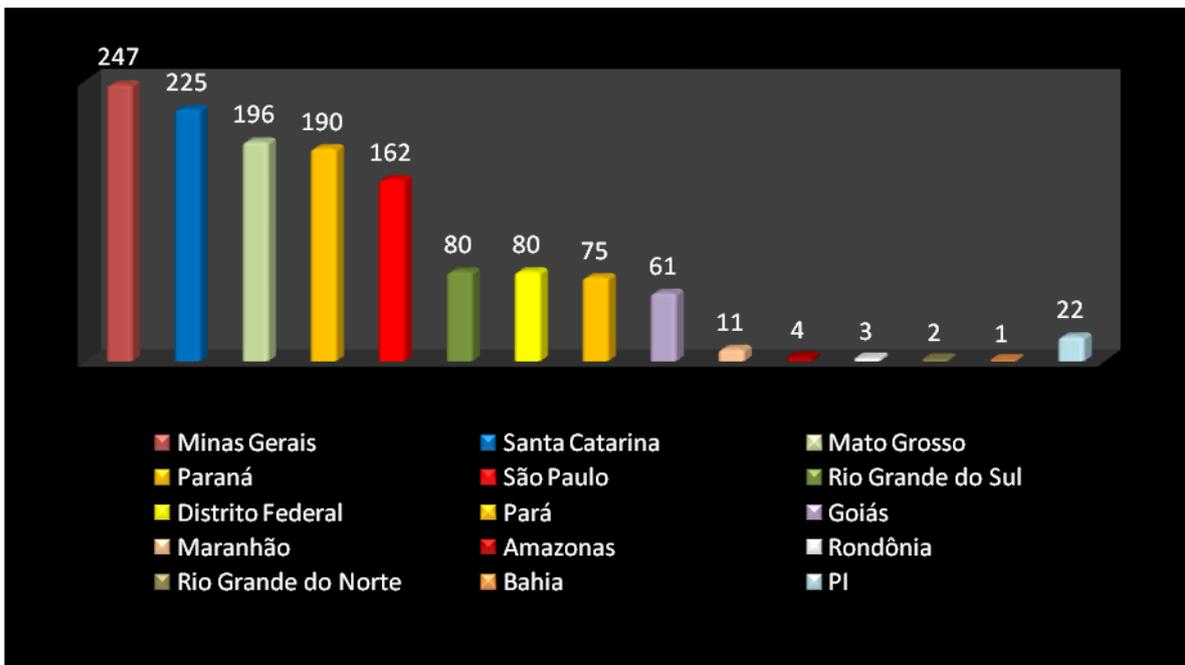
Cepas relacionadas ao *vírus* Juquitiba (Juquitiba-like) também foram identificadas no Uruguai em casos de SPH, bem como em roedores das espécies *Oligoryzomys nigripes* e *Oligoryzomys nasutus* (DELFRANO et al., 2008), bem como no Parque Nacional da Serra dos Órgãos no Rio de Janeiro, em roedores *O. nigripes* (OLIVEIRA et al., 2009).

A associação de hantavírus a casos leves e/ou assintomáticos tem sido sugerida por inquéritos sorológicos em seis municípios da microrregião dos alagados, no estado do Maranhão, sem, no entanto, haver relatos de casos de infecção clássica de SPH (MENDES et al., 2010).

Estudos também comprovaram a circulação do vírus *Laguna Negra-like*, em roedores da espécie *Calomys callidus* (TRAVASSOS DA ROSA – dados não publicados) e a sua associação com casos humanos de SPH no estado do Mato Grosso (RABONI et al., 2009).

Até dezembro de 2010 já foram notificados pelo Ministério da Saúde 1.538 casos da SPH no Brasil, dos quais 190 (12,35%) ocorreram no Paraná, 247 (16,05%) em Minas Gerais, 225 (14,62%) em Santa Catarina, 162 (10,53%) em São Paulo, 196 (12,74%) no Mato Grosso, 80 (5,20%) no Rio Grande do Sul, 80 (5,20%) no Distrito Federal, 61 (3,97%) em Goiás, 75 (4,88%) no Pará, 11 (0,72%) no Maranhão, quatro (0,26%) no Amazonas, dois (0,13%) no Rio Grande do Norte, um (0,08%) na Bahia, três (0,20%) em Rondônia e 22 (1,43%) de procedência indeterminada ou ignorada (Figura 1) (MS/SVS, 2010).

Figura 1- Distribuição dos casos de SPH ocorridos no Brasil, de 1993 até dezembro de 2010. Somam-se ainda 22 casos de procedência indeterminada e/ou ignorada.



Fonte: Adaptado do Ministério da Saúde, 2010.

4.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA SPH

A SPH apresenta-se como doença febril aguda com grave comprometimento cardiovascular e respiratório, sendo que, o seu reconhecimento precoce, baseando-se nos sinais e sintomas iniciais não é fácil de ser realizado, já que o quadro clínico pode confundir-se com outras doenças endêmicas, tais como a dengue e a leptospirose (RUBINAS et al., 2004; CAMPOS et al., 2009). O período de incubação foi estabelecido entre 9 a 33 dias (média de 14 a 17 dias) segundo estudo realizado em pacientes com relato de exposição a roedores (YOUNG et al., 2000).

A SPH apresenta quatro fases clínicas distintas. A primeira é a prodrômica que dura de três a seis dias, podendo observar-se febre, mialgias, náuseas, diarreia e, menos frequentemente, cefaléia, vômitos, dor abdominal e torácica, sudorese e vertigem, tosse e dispnéia. Sintomas semelhantes à influenza tipos A e B, resfriado comum, gastroenterite inespecífica ou mesmo dengue podem ser observados (CAMPOS et al., 2009).

A segunda é a fase cardiorespiratória da doença, caracterizada por taquipnéia, hipoxemia e taquicardia, muitas vezes requerendo ventilação mecânica, sendo que, a hipotensão nessa fase é comum podendo evoluir para o choque. Nesta fase a doença pode ser confundida com estafilococcias, pneumonia atípica por *Chlamydia*, *Parainfluenza* tipo 4, *Paramyxovírus* ou *Mycoplasma*, Leptospirose (forma pulmonar), pneumocistose e sepsis, além de outras causas não pulmonares, como valvulopatias e Síndrome de Goodpasture (RUBINAS et al., 2004; CAMPOS et al., 2009).

A terceira, fase diurética, se caracteriza pela eliminação de líquido do edema pulmonar e a resolução da febre e do choque. A quarta fase é a da convalescença, que pode durar de duas semanas até dois meses nos casos mais graves, na qual o paciente pode apresentar, segundo alguns autores, sequelas como hipertensão, insuficiência renal crônica ou outras (IVERSSON, 1996; FIGUEIREDO et al., 2001).

4.3 ASPECTOS VIROLÓGICOS

4.3.1 Taxonomia

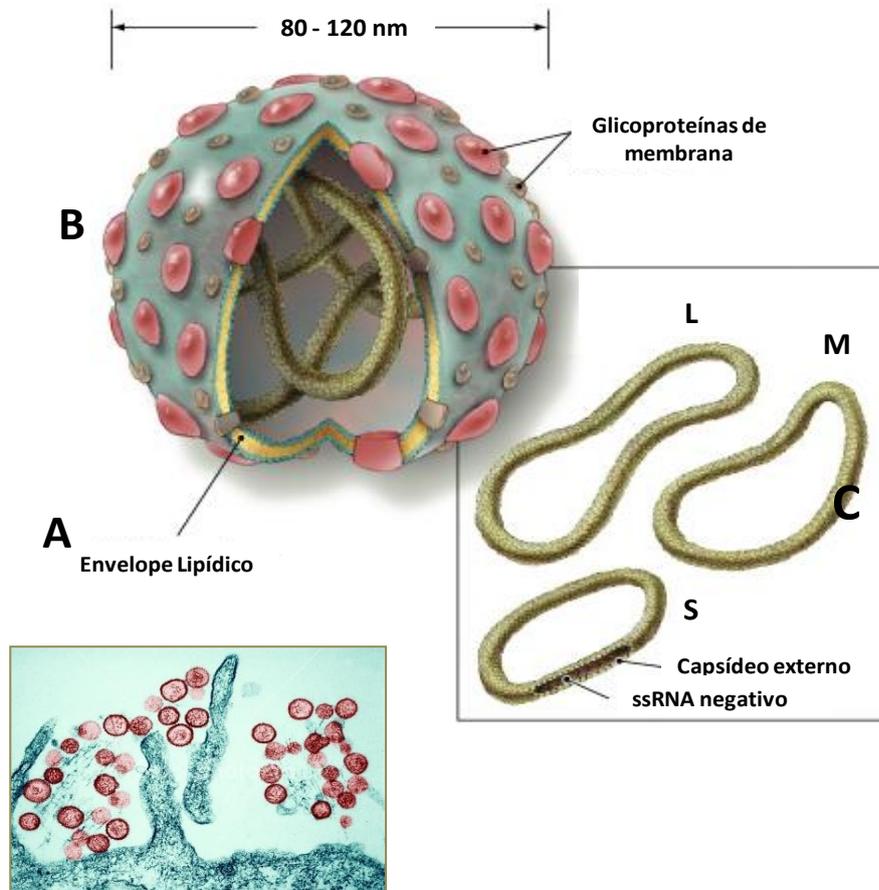
O gênero *Hantavirus* compreende mais de 35 membros distintos conhecidos e a denominação do agente deriva da região onde foi descrito pela primeira vez (SCHMALJOHN, 1985; ICTV, 2005).

No oitavo relato do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (CITV) quatro critérios foram estabelecidos para definir as distintas espécies de hantavírus. De acordo com esses critérios, as espécies de hantavírus: 1º - devem estar associadas a um único nicho ecológico (em espécies ou subespécies distintas de roedores reservatórios primários); 2º - exibir, pelo menos, 7% de divergência em relação à identidade aminoacídica em comparação às sequências completas das proteínas N e glicoproteína precursora; 3º - mostrar uma diferença de, no mínimo, quatro vezes, em dois sentidos, nos testes de neutralização cruzada; e 4º - não formar rearranjos naturais com outros hantavírus (ICTV, 2005; PLYUSNIN, 2002).

4.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURA GENÔMICA

Os hantavírus, assim como os demais membros da família *Bunyaviridae*, possuem morfologia esférica ou pleomórfica, medindo de 80 a 120 nm de diâmetro (Figura 2) (ICTV, 2005; LEDNICK, 2003), com simetria helicoidal. Apresentam projeções glicoprotéicas na superfície medindo de 5 a 10 nm inseridas no envelope lipídico que é sensível ao tratamento com solventes lipídicos ou detergentes não iônicos, o que resulta na perda da capacidade infecciosa (OBIJESKI E MURPHY, 1977; SCHMALJOHN, 1996; MERTZ, 1997).

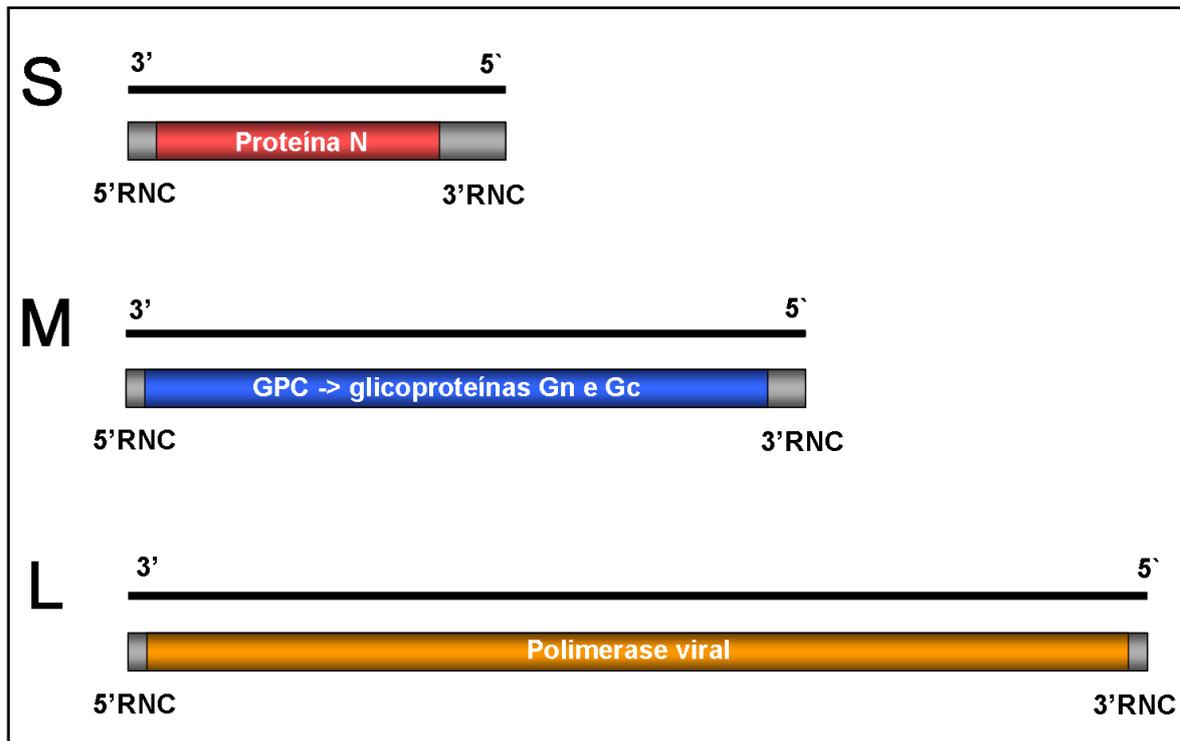
Figura 2 - A figura 2A mostra a microscopia eletrônica evidenciando partículas virais esféricas em brotamento. A figura 2B representa esquematicamente a estrutura da partícula viral de um membro da família *Bunyaviridae*, da qual pertence o gênero *Hantavirus*, mostrando, em detalhes, a partícula viral de 80 a 120nm de diâmetro, bem como, as glicoproteínas Gn e Gc, localizadas na membrana viral. A figura 2C evidencia os três nucleocapsídeos helicoidais circulares, compreendendo cada um dos segmentos de RNA de polaridade negativa dos hantavírus (segmentos S, M e L).



Fonte: Adaptado do site http://www2.bakersfieldcollege.edu/bio16/22_Resppictures.htm

O genoma dos hantavírus é de RNA trisegmentado, fita simples, sentido negativo, possui um segmento grande (do inglês *large* - L), cujo comprimento é de aproximadamente 6500 nucleotídeos, um segmento médio (*medium* - M), variando entre 3600 a 3800 nucleotídeos e um segmento pequeno (*small* - S), com comprimento aproximado de 1700 a 2100 nucleotídeos (Figura 3) (ELLIOT et al., 1991; ICTV, 2005).

Figura 3 - Esquema mostrando o segmento S (menor) que codifica a proteína N do nucleocapsídeo, segmento M (médio), o qual codifica a glicoproteína precursora (GPC) que origina as glicoproteínas Gn e Gc do envelope viral e o segmento L que é responsável pela codificação da Polimerase viral RNA-dependente. As extremidades 5' e 3' em cinza correspondem às regiões não codificantes (5'-RNC e 3'-RNC) do genoma dos hantavírus.



Fonte: Adaptado de PLYUSNIN et al., 1996.

Cada segmento apresenta uma única matriz de leitura aberta (*Open Reading Frame* - ORF), que é processada pós-traducionalmente. Desta forma, o segmento L codifica uma polimerase viral dependente de RNA, com um peso molecular aproximado de 250 kDa. O segmento M codifica a glicoproteína precursora, que posteriormente é clivada durante sua tradução nas duas glicoproteínas Gn e Gc do envelope, com peso molecular de aproximadamente 70 kDa e 50 kDa, respectivamente. O segmento S codifica a proteína N do nucleocapsídeo de aproximadamente 50 kDa. (NICHOL et al., 1996). Uma ORF para uma possível proteína não-estrutural NS (7-10 KDa) no segmento S foi encontrada em vários hantavírus do Novo Mundo, como o VBAY, VBCC, VNY, VPUUL, dentre outros (PLYUSNIN, VAPALAHTI E VAHERI, 1996) e também em cepas de hantavírus do Novo Mundo, como é o caso das cepas do vírus *Andes* (VAND), encontrado na Argentina (TISCHLER et al., 2003).

Como todos os membros da família *Bunyaviridae*, as sequências nucleotídicas consenso terminais dos segmentos genômicos S, M e L são não-codificadoras: AUCAUCAUCUG..., no terminal 3' e UAGUAGUA..., no terminal 5' (MAcCAUGHEY E HART, 2000; SCHMALJOHN E DALRYMPLE, 1983). Essas regiões não-codificadoras terminais (RNC) 5' e 3' são altamente conservadas e complementares entre si, permitindo a formação, por meio do pareamento de bases, de estruturas estáveis em formato de raquete (*panhandle*), característica dos membros da família *Bunyaviridae*, que provavelmente, conferem o aspecto circular do RNA observado em microscopia eletrônica. Esta região de complementaridade deve também ter importante participação na replicação, provavelmente servindo como uma estrutura de reconhecimento para a RNA Polimerase dependente de RNA (KUKKONEN et al., 1998; ICTV, 2005).

A nucleoproteína N, codificada pelo segmento S é a proteína mais abundante dos hantavírus, sendo detectada seis horas após a infecção e é altamente imunogênica em humanos, o que a torna a primeira escolha como reagente em testes diagnósticos para detecção desta infecção viral (PLYUSNIN et al., 1996).

As duas glicoproteínas Gn e Gc, ancoradas na membrana do envelope viral por sua região transmembrana C-terminal são responsáveis pelo reconhecimento dos receptores e entrada dos vírus nas células-alvo através da fusão entre as membranas celular e viral. Induzem a formação de anticorpos neutralizantes e são capazes de aglutinar eritrócitos de ganso (GAVRILOVSKAYA et al., 1998; KIM et al., 2002; OGINO et al., 2004).

Com relação ao segmento L, deve-se considerar que, comparações de sequências nucleotídicas e de aminoácidos demonstram que há uma conservação na estrutura primária da proteína precursora nos diversos hantavírus, apesar da extrema variabilidade na sequência nucleotídica. A proteína L tem ação de replicase, transcriptase e endonuclease (PLYUSNIN et al., 2002; TISCHLER et al., 2003)

4.5 REPLICAÇÃO VIRAL

A transmissão entre roedores silvestres ocorre principalmente através de mordidas e a infecção humana é comumente resultado da inalação de aerossóis das excretas de roedores contendo os vírus. A partir da inalação das partículas virais

pelos humanos susceptíveis, a replicação dos hantavírus ocorre exclusivamente no citoplasma da célula hospedeira (SCHMALJOHN, 1996).

A entrada do vírus na superfície das células endoteliais, macrófagos e plaquetas se dá por meio da interação de uma ou ambas as proteínas do envelope viral (Gn e Gc) com receptores β -3 integrinas específicos da célula hospedeira sofrendo, em seguida, endocitose (GAVRILOVSKAYA et al., 1998; GLARSON et al., 2005; SONG et al., 2005). Após a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, o nucleocapsídeo atinge o citoplasma, iniciando-se desta forma, o processo de transcrição dos genes virais, onde a polimerase viral sofre ativação e transcreve primariamente os segmentos do genoma (S, M e L) RNA (-) a RNA (+) complementar (que servirá de RNAm) (SCHMALJOHN E DALRYMPLE, 1994).

Segue-se a tradução dos RNAm dos segmentos S e L por ribossomos livres, e a dos RNAm do segmento M por ribossomos associados ao retículo endoplasmático (RE), onde ocorre a clivagem da poliproteína traduzida originando as glicoproteínas Gn e Gc, e posterior glicosilação primária destas. Após estes eventos, as glicoproteínas acumulam-se nas cisternas do Complexo de Golgi (CG) onde sofrem uma glicosilação terminal e associam-se aos nucleocapsídeos, formando os vírions, que brotam das cisternas e são transportados em vesículas até a membrana celular, fundindo-se com esta e sofrendo exocitose (SCHMALJOHN E PATTERSON, 1991).

4.6 ECOEPIDEMIOLOGIA

4.6.1 Dinâmica da infecção

Os hantavírus são mantidos em natureza mediante infecção crônica de roedores silvestres. Nestes animais, a infecção aparentemente não é letal e o vírus pode ser isolado, principalmente, de fragmentos de pulmões e rins, sendo concentrados e eliminados em quantidades detectáveis na saliva, urina e fezes (EASTERBROOK E KLEIN, 2008). Por algum desequilíbrio no habitat do roedor, este é atraído para o peridomicílio ou até mesmo dentro das casas, depositando suas excretas, que ressecam com o tempo, podendo ser inaladas (FERREIRA, 2003).

Portanto, os hantavírus são transmitidos ao homem pelo contato ou pela inalação de aerossóis de excretas dos roedores infectados, que transmitem os vírus entre si por meio de arranhaduras e mordeduras causadas por encontros agressivos. Ressalte-se que, a infecção humana ocorre mais comumente na área rural, onde as habitações são construídas a menos de 40m de distância das matas (LEE, 1988; FERREIRA, 2003).

Tem sido descritas outras formas de transmissão menos comuns, como o contato com membranas mucosas ou ferimentos de pele da pessoa infectada, e ainda, a rara transmissão de pessoa para pessoa, por via aérea, identificada em 1996, em El Bolsón, Bariloche e Esquel, sudeste da Argentina, em um surto de doença respiratória causada pelo vírus *Andes* (VAND) (ENRIA et al., 1996; PADULA et al., 1998). Posteriormente, outros casos de transmissão interhumana foram relatados na Argentina (CASTILLO et al., 2000; MARTINEZ et al., 2005) e no Chile (FERRES et al., 2007).

O perfil agrícola, com extensas áreas de lavouras, favorecendo a manutenção de grandes populações de roedores silvestres, é fator determinante para a infecção por hantavírus, pois quando o alimento fornecido por estas lavouras esgota-se periodicamente, os roedores segregados pela competição partem à procura de alimento nas residências, tulhas e silos ao redor (PEREIRA et al., 1998).

O desequilíbrio na população dos roedores gerado pelo aumento da oferta de alimentos devido a um período prolongado de chuvas também é fator crucial para as infecções, uma vez que, restabelecidas as condições climáticas normais, a oferta de alimento decai, levando a população de roedores a procurar alimentos nas residências rurais, facilitando o seu contato com o homem. Já no fenômeno conhecido como “ratada”, o aumento na população de roedores se dá pela floração e frutificação cíclica de determinadas espécies de taquaras nativas da Mata Atlântica. Cita-se ainda, como agravante, o desmatamento das áreas de “ratada” para construção de habitações precárias, onde é armazenada ração para alimentação própria e de animais domésticos (PEREIRA et al., 1998; JAKSIC E LIMA, 2003).

Os roedores pertencentes à determinada família, parecem compartilhar longa co-evolução roedor-vírus. Desta forma, cada vírus está associado a uma espécie específica de roedor hospedeiro pertencente à família Muridae, subfamílias Murinae e Arvicolinae, no Velho Mundo e à família Cricetidae, subfamília Sigmodontinae, no Novo Mundo, como mostra o quadro 1. A alta especificidade

entre vírus e hospedeiro existente para os hantavírus e roedores, respectivamente, levanta a hipótese da existência de uma linhagem de hantavírus ancestral coexistente a uma espécie de murídeo que emergiu antes das linhagens das subfamílias destes roedores divergirem há aproximadamente 30 milhões de anos, sugerindo-se a co-especiação e co-evolução entre vírus e hospedeiro como um dos mecanismos para explicar a existência de numerosos hantavírus (SCHMALJOHN E HJELLE, 1997).

Quadro 1. Principais hantavírus isolados no mundo. Distribuição de acordo com local de ocorrência, fonte de obtenção e doença associada. Em vermelho os hantavírus brasileiros e asterisco corresponde aos casos de *spillover* dos reservatórios.

Vírus	Doença	Reservatório principal	País	Distribuição
Velho Mundo				
Dobrava-Belgrade	FHSR	<i>Apodemus flavicollis</i>	Eslovênia	Europa
Hantaan	FHSR	<i>Apodemus agrarius</i>	Coréia	Ásia, Europa
Khabarovsk	-	<i>Microtus fortis</i>	Rússia	Ásia
Puumala	FHSR	<i>Chletrionomys glareolus</i>	Finlândia	Europa
Seoul	FHSR	<i>Rattus norvegicus</i> , <i>Rattus rattus</i>	Coréia	Ásia, Europa, América
Thailand	FHSR	<i>Apodemus flavicollis</i>	Tailândia	Ásia
Thottapalayam	-	<i>Suncus murinus</i>	Índia	Ásia
Topografov	-	<i>Lemmus sibiricus</i>	Rússia	Ásia, América do Norte
Tula	-	<i>Microtus arvalis</i>	Rússia	Europa
Novo Mundo				
Andes	SPH	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	Argentina	América do Sul
Anajatuba	SPH	<i>Oligoryzomys fornesi</i> * <i>Necromys lasiurus</i>	Brasil	América do Sul
Araraquara	SPH	<i>Necromys lasiurus</i>	Brasil	América do Sul
Bayou	SPH	<i>Oryzomys palustris</i>	EUA	América do Norte
Bermejo	-	<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	Argentina	América do Sul
Black Creek Canal	SPH	<i>Sigmodon hispidus</i>	EUA	América do Norte
Calabazo	-	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Panamá	América Central
Caño Delgadito	-	<i>Sigmodon alstoni</i>	Venezuela	América do Sul
Castelo dos Sonhos	SPH	<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>	Brasil	América do Sul
Choclo	SPH	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	Panamá	América Central
El Moro Canyon	-	<i>Reithrodontomys megalotis</i>	EUA	América do Norte
Islã Vista	-	<i>Microtus californicus</i>	EUA	América do Norte
Juquitiba	SPH	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Brasil	América do Sul
Laguna Negra/ Laguna Negra-like	SPH SPH	<i>Calomys laucha</i> , * <i>C. callosus</i> / <i>C. callidus</i>	Paraguai, Argentina, Bolívia/ Brasil	América do Sul
Lechiguanas	SPH	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Argentina	América do Sul
Maciel	-	<i>Necromys obscurus</i>	Argentina	América do Sul
Muleshoe	-	<i>Sigmodon hispidus</i>	EUA	América do Norte
New York	SPH	<i>Peromyscus leucopus</i>	EUA	América do Norte
Oran	SPH	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	Argentina	América do Sul
Pergamino	-	<i>Akodon azarae</i>	Argentina	América do Sul
Prospect Hill	-	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	EUA	América do Norte
Rio Segundo	-	<i>Reithrodontomys mexicanus</i>	Costa Rica	América Central
Rio Mamoré	-	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Bolívia	América do Sul
Rio Mearim	-	<i>Holochilus sciureus</i>	Brasil	América do Sul
Sin Nombre	SPH	<i>Peromyscus maniculatus</i>	EUA	América do Norte

Fonte: Adaptado de LEVIS, 1998; JOHNSON et al., 1999; VINCENT et al., 2000; RABONI et al., 2009; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2010; 2011.

Apesar da alta especificidade, eventualmente, pode-se encontrar o mesmo hantavírus infectando espécies de roedores distintas, relacionadas ou não ao mesmo gênero, em um fenômeno conhecido como *spillover*. Esse fenômeno pode ser observado nas Américas com o *virus Laguna Negra* (VLN), cujo reservatório natural primário é o roedor *Calomys laucha*, também encontrado em amostras de pulmões de *C. callosus*, segundo estudo realizado em Yuto, noroeste da Argentina (LEVIS et al., 2004) e também, o roedor *Calomys callidus* associado ao *virus Laguna Negra-like*, no Brasil, estado do Mato Grosso (TRAVASSOS DA ROSA, 2008). Da mesma forma, o *Peromyscus maniculatus* é o reservatório principal do VSN, mas, *Peromyscus boylii*, *Peromyscus truei* e *Peromyscus leucopus* também apresentam altas taxas de anticorpos reativos para este hantavírus (MILLS et al., 1997). Outro exemplo é o VANAJ, que tem como reservatório primário o roedor *Oligoryzomys fornesi*, mas também foi associado ao roedor *Necromys lasiurus* (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2008; 2010).

Embora a maioria dos reservatórios sejam roedores, anticorpos contra hantavírus também tem sido encontrados em animais domésticos como, gatos, cachorros, porcos, gado (replicação do vírus em células aórticas endoteliais bovinas) e selvagens como veado, orangotango da espécie *Pongo pygmaeus* (CHEN et al., 2010) e, ainda, em morcegos (KIM, LEE E PARK, 1994; JUNG E KIM, 1995). Animais domésticos e roedores vivem juntamente em habitats similares, portanto a transmissão de hantavírus a animais domésticos parece ser possível, desde que existam receptores adequados para a entrada dos vírus e replicação em tecidos, órgãos-alvos e parênquima celular (MALECKI et al., 1998; MURÁNYI et al., 2004).

Estudos de pequenos mamíferos capturados em regiões endêmicas de FHSR tem sugerido que musaranhos (Família *Soricidae*) e toupeiras (Família *Talpidae*) também servem como hospedeiros reservatórios dos hantavírus (SONG et al. 2007, ARAI et al., 2008; KANG et al., 2010).

4.6.2 Distribuição Geográfica dos hantavírus e hospedeiros

Tem-se verificado notável frequência de infecção por hantavírus em espécies de roedores silvestres do Velho e Novo Mundos, com exceção do VSEO, que é encontrado infectando *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*, espécies urbanas e amplamente distribuídas em todos os continentes. Nas Américas, apesar da

ausência de roedores nativos da subfamília *Murinae*, reservatórios estes responsáveis pela doença no homem, os hantavírus associados à FHSR provavelmente foram introduzidos juntamente com os muríneos, como o rato do telhado (*Rattus rattus*) e a ratazana (*Rattus norvegicus*), hospedeiros do VSEO (LEE, 1988).

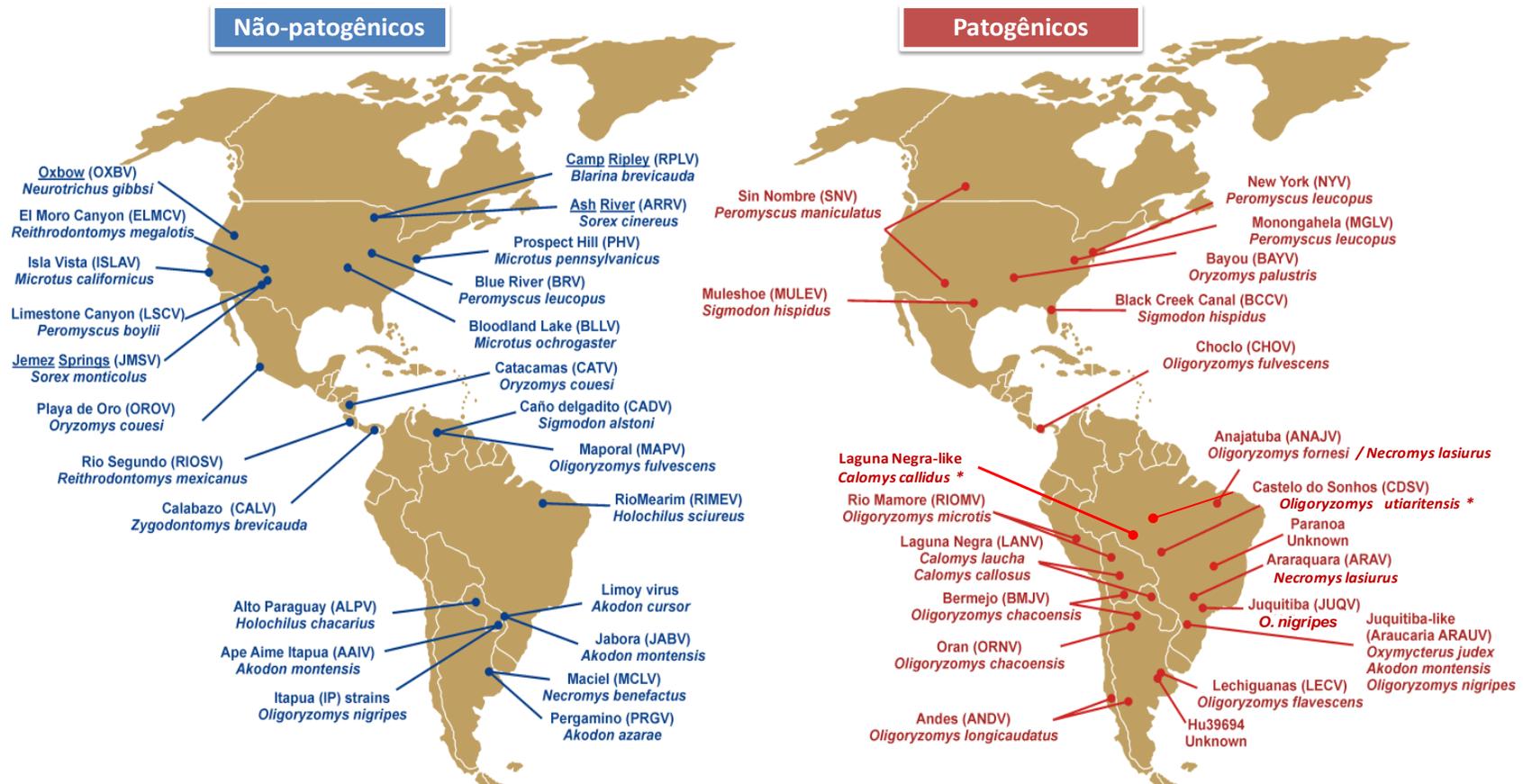
Esta hipótese foi corroborada em inquéritos sorológicos realizados por estudos colaborativos no Brasil, pelo IEC, e laboratórios dos Estados Unidos e da Coréia, que revelaram a presença de anticorpos IFA (7,4%) para o VHTN em residentes de várias localidades da Amazônia. Posteriormente, se comprovou a imunidade para o agente em 56% dos ratos de Belém, 14% de São Paulo e 6% de Recife e Olinda. Em 1983, se obteve o primeiro isolamento de um vírus do gênero *Hantavirus* na América do Sul, a partir das vísceras de um *Rattus norvegicus*, capturado em Belém, que na sua identificação mostrou tratar-se de amostra antigenicamente relacionada ao VSEO (LE DUC et al., 1985; 1986).

Na América do Sul, vários hantavírus têm sido identificados, tais como: no Brasil o VJUQ (IVERSSON et al., 1994), VARA (JOHNSON et al., 1999), VANAJ (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2005), vírus *Rio Mearim* - VRIME (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2005), associados aos roedores *Oligoryzomys nigripes*; *Necromys lasiurus*, *Oligoryzomys fornesi*, *Holochilus sciureus*, respectivamente, e o VCAS, recentemente associado ao *Oligoryzomys utiaritensis* (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2011). ; VLN, associado aos roedores *Calomys laucha* no Paraguai e Bolívia (JOHNSON et al., 1997) e *C. callosus* no noroeste da Argentina (LEVIS et al., 2004) e a variante *Laguna Negra-like* circulante no Brasil associado ao roedor *Calomys callidus* (TRAVASSOS DA ROSA, 2008); vírus *Rio Mamoré* (VRIOM), encontrado em roedores *Oligoryzomys microtis*, na Bolívia (BHARADWAJ et al., 1997; RICHTER et al., 2010) e Peru (POWERS et al., 1999); vírus *Caño Delgado* (VCANO), associado ao *Sigmodon alstoni*, na Venezuela (FULHORST et al., 1997). Na Argentina sete genótipos diferentes têm sido identificados, sendo quatro deles associados com a doença humana, incluindo o VAND, vírus *Lechiguanas* (VLEC), vírus *Orán* (VORN) (LEVIS et al., 2004) e vírus *Bermejo* (VBMJ) (PADULA et al., 2002) (Figura 4).

Há maior diversidade dentre os hantavírus sul americanos em comparação aos vírus da América do Norte e Central (Figura 4). A distribuição geográfica dos hospedeiros define a área máxima na qual a doença pode ser endêmica, sendo que, para muitas espécies de roedores, essa distribuição já é

bastante conhecida, a exemplo do reservatório do vírus Andes (*Oligoryzomys longicaudatus*), que causa SPH na região norte da Patagônia, Argentina e Chile (PEREIRA et al., 1998; JOHNSON et al, 1999;).

Figura 4 - Distribuição geográfica dos hantavírus e seus roedores reservatórios nas Américas mostrando a maior diversidade dos hantavírus sul americanos em relação aos hantavírus da América do Norte e Central. Espécies de patogenicidade desconhecida (azul) e patogênicas (vermelho) para os humanos. Os vírus encontrados em *Soricomorpha* (musaranhos, toupeiras) estão sublinhados. Asterisco refere-se aos roedores recentemente associados aos hantavírus *Laguna Negra-like* e *Castelo dos Sonhos*, circulantes no Mato Grosso (TRAVASSOS DA ROSA, 2008; 2011).



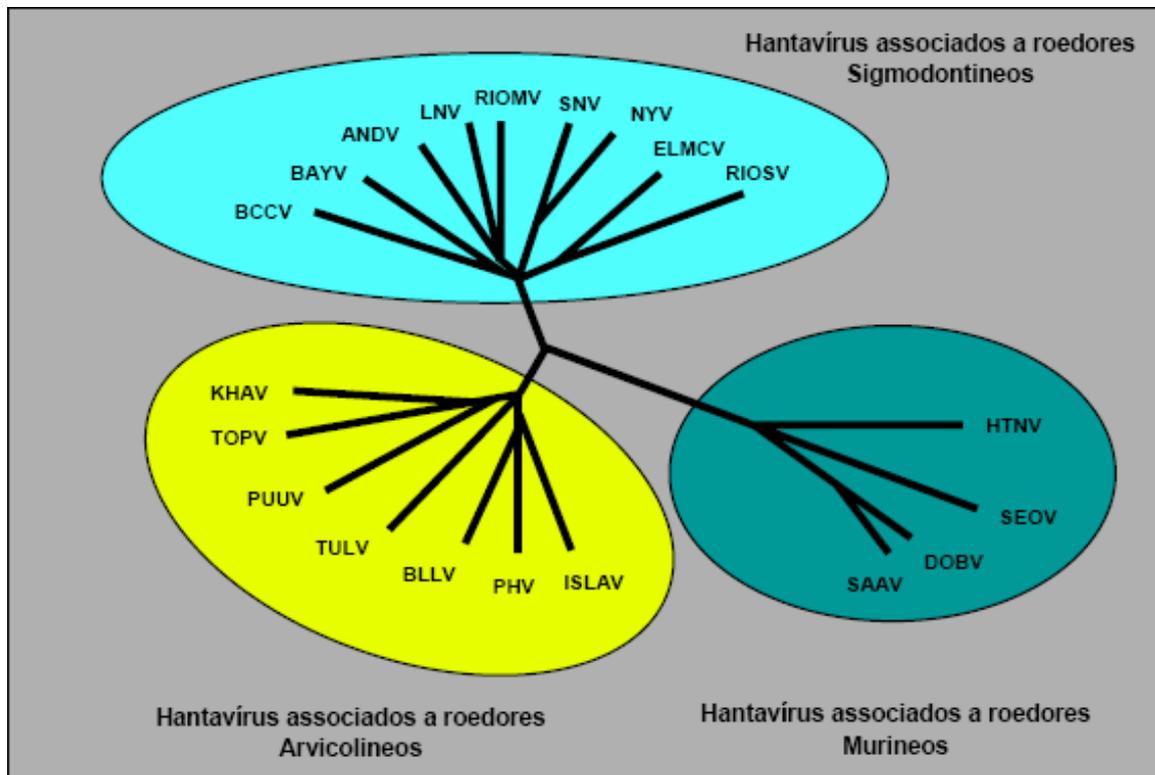
Fonte: Adaptado de HJELLE E TORRES-PÉREZ, 2010

4.7 FILOGENIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DOS HANTAVÍRUS

Desde que a evolução dos hantavírus segue a de seus hospedeiros naturais, a infecção persistente nesses animais fornece a oportunidade de acúmulos de mutações (acúmulo de substituições de bases e deleções/inserções, denominadas *indels*) e rearranjo dos segmentos genômicos, dois dos principais mecanismos que conduzem à evolução dos vírus de RNA. Investigações genéticas de muitos membros da família *Bunyaviridae* têm mostrado que o acúmulo de mutações e os rearranjos genômicos parecem ser responsáveis pela diversidade genética na família (ELLIOTT, 1996). Os rearranjos heterólogos (inter-tipo) não tem sido observados, existindo variantes virais geradas pelo rearranjo entre os segmentos genômicos entre cepas pertencentes ao mesmo tipo, como é o caso da sublinhagem *Kosice* do grupo do *virus Tula* (VTUL) (PLYUSNIN et al., 1994; 1996; 2002; JOHNSON et al., 1997; SIBOLD et al., 1999)

A análise filogenética dos segmentos S, M e L dos hantavírus associados aos seus roedores reservatórios mostra uma longa co-evolução vírus/hospedeiro, sendo reconhecidos três grupos geneticamente distintos de hantavírus: hantavírus associados às subfamílias *Murinae* (I), *Arvicolinae* (II) e *Sigmodontinae* (III). Os hantavírus Arvicolíneos estão mais próximos evolutivamente dos Sigmodontíneos, do que cada um com os Muríneos, em virtude da ancestralidade comum entre as subfamílias *Arvicolinae* e *Sigmodontinae* (Figura 5) (PLYUSNIN, 2002).

Figura 5 - Árvore filogenética baseada nas sequências dos hantavírus associados aos seus reservatórios das subfamílias *Sigmodontinae*, *Arvicolinae* e *Murinae*, sugerindo a co-evolução entre eles.



Fonte: TRAVASSOS DA ROSA, 2008.

Legenda: BCCV (*Black Creeck Canal virus*); BAYV (*Bayou virus*); ANDV (*Andes virus*); LNV (*Laguna Negra virus*); RIOMV (*Rio Mamoré virus*); SNV (*Sin Nombre virus*); NYV (*New York virus*); ELMC (*El Moro Canyon virus*); RIOSV (*Rio Segundo virus*); KHAV (*Khabarovisk virus*); TOPV (*Topografov virus*); PUUV (*Puumala virus*), TULV (*Tula virus*); BLLV (*Bloodland Lake*); PHV (*Prospect Hill virus*); ISLAV (*Isla Vista virus*); HTNV (*hantaan virus*); SEOV (*Seoul virus*); DOBV (*Dobrava virus*); SAAV (*Saarema virus*).

De modo geral, a relação hantavírus-roedor também se estende a nível de espécie e está ligada a um nicho ecológico distinto, o que, provavelmente, faz parte da estratégia de sobrevivência do vírus. Esse fato sugere que a filogenia dos hantavírus, sua distribuição geográfica e o quadro clínico estejam altamente relacionados à distribuição dos respectivos reservatórios, demonstrando a co-evolução entre eles (PLYUSNIN et al., 1996; PLYUSNIN, 2002).

Os ensaios de RT-PCR seguidos de sequenciamento nucleotídico, constituem métodos rápidos de caracterização genética de novos hantavírus, mesmo sem obter-se o isolamento viral. Esses métodos podem ser aplicados em tecidos e sangue/soro humanos, bem como de tecidos e/ou sangue de roedores ou ainda de vírus obtidos em culturas de células. Existem, por vezes, diferenças

significativas entre os vírus isolados de cada região ou país, complicando o uso e a sensibilidade da técnica para utilização no apoio ao diagnóstico rotineiro das hantaviroses (JENISON et al., 1995; PETERS, 1998; TERAJIMA et al., 1999; FERREIRA, 2003).

Na caracterização molecular de hantavírus, são utilizados mais comumente os segmentos S e M, pois possuem menor variabilidade genética em comparação ao segmento L. Quando se compara as sequências nucleotídicas desses dois segmentos, entre vírus de um mesmo genótipo, observa-se um percentual de identidade muito similar, sugerindo que, estes segmentos tenham evoluído em paralelo (LÓPEZ et al., 1997).

Estudos comparativos de sequências nucleotídicas e de aminoácidos entre distintos hantavírus, têm demonstrado uma discreta variação entre as sequências de aminoácidos da nucleoproteína e uma variação mais extensa entre as glicoproteínas Gn e Gc. É razoável atribuir este achado de menor variabilidade da nucleoproteína à menor pressão seletiva a que N é submetida, quando comparada com as glicoproteínas, que fazem parte da superfície dos vírus e, conseqüentemente sofrem maior pressão do ambiente (VINCENT et al., 2000).

4.8 PREVENÇÃO E CONTROLE

Dentre as estratégias de prevenção, cita-se a ação educativa, no sentido de divulgar informações sobre a doença aos diversos setores da população (profissionais de saúde, lideranças políticas, empresas de extração de madeiras ou outras lideranças comunitárias e população em geral).

Ademais, a estratégia para prevenir as hantaviroses baseia-se na implementação de medidas que impeçam o contato do homem com os roedores e suas excretas, dentre elas estão: (i) as construções rurais para habitação humana e para deposição de grãos e rações devem conter alguma forma de proteção contra a entrada desses animais (tela metálica de malha fina, por exemplo); (ii) construções fechadas há várias semanas ou meses em áreas rurais devem ser, primeiramente, abertas para ventilação por, no mínimo, 30 minutos e qualquer limpeza no local evitada, para não permitir a aerossolização de partículas virais; (iii) da mesma forma, deve-se evitar o contato com roedores mortos ou vivos, eventualmente capturados no domicílio. Máscaras com filtro do tipo P3 devem ser utilizadas na exploração ou

limpeza de ambientes sabidamente contaminados; (iv) todos os alimentos para uso humano ou animal (cereais e rações, por exemplo) necessitam de acondicionamento em depósitos plásticos, hermeticamente fechados, para impedir o acesso de roedores; (v) atividades de lazer (caça ou pesca, acampamentos) desenvolvidas em áreas rurais ou florestais acarretam riscos de aquisição dessa virose; precauções devem ser tomadas, portanto, para impedir o contato com ambientes contaminados. (FERREIRA, 2003).

Não existe vacina para prevenção da SPH devido à frequência desta doença ser relativamente mais rara, desta forma, os esforços têm sido direcionados a FHRS, cujos estudos clínicos têm avançado no que diz respeito ao desenvolvimento de vacinas convencionais e moleculares contra os hantavírus causadores desta síndrome (SCHMALJOHN, 2009).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

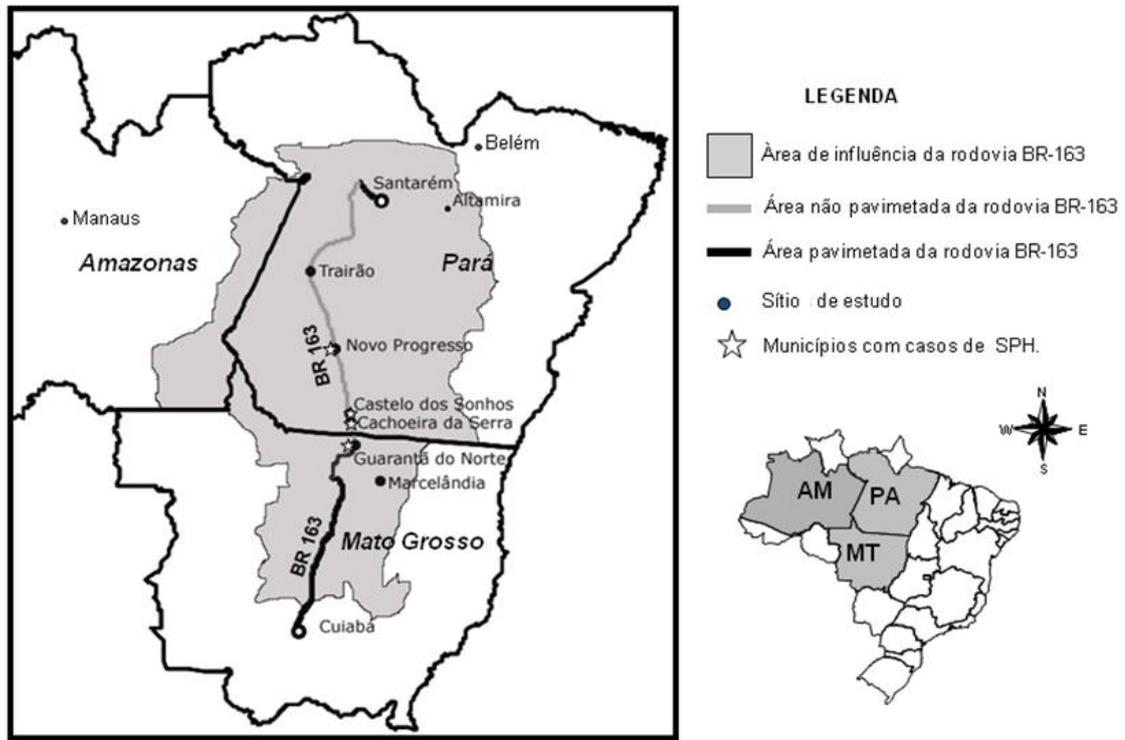
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS DO ESTUDO

Para este estudo foram selecionadas amostras de roedores e casos humanos confirmados de SPH procedentes de municípios pertencentes a cinco estados situados na Amazônia brasileira: Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará e Rondônia, e da área de influência da Rodovia federal BR-163 nos estados do Pará e Mato Grosso. Para a realização do estudo foi solicitado à diretoria do IEC autorização para a utilização das amostras, conforme comitê de ética e pesquisa da Instituição. O documento enviado com a aprovação da diretoria encontra-se em anexo (Anexo 1).

5.1.1 Área de influência da Rodovia BR-163

A Rodovia BR-163 foi construída em 1973 e conecta os municípios de Cuiabá, capital do estado do Mato Grosso, ao município de Santarém, a principal cidade porto do Rio Tapajós, estado do Pará. A área de influência da Rodovia BR-163 é representada por uma área de 1,2 milhões de quilômetros quadrados, compreendendo 71 municípios diferentes no sudeste do Pará, sudoeste do Amazonas e norte do Mato Grosso, na Amazônia Brasileira (Figura 6). A área da Rodovia BR-163 compreende um total de 14,4% do território nacional e 20% da região Amazônica. Nesta área, há diferentes populações quilombolas urbanas e rurais, e mais de 30 tribos indígenas, em um total de aproximadamente dois milhões de pessoas, vivendo e sustentando-se, principalmente, através da agricultura, extração madeireira e vegetal, e pecuária (IBGE, 2010).

Figura 6 - Mapa da região Amazônica evidenciando os estados do Pará (PA), Mato Grosso (MT) e Amazonas (AM) mostrando a rodovia BR-316, a qual conecta os municípios de Santarém, no Pará, com Cuiabá, a capital do MT.

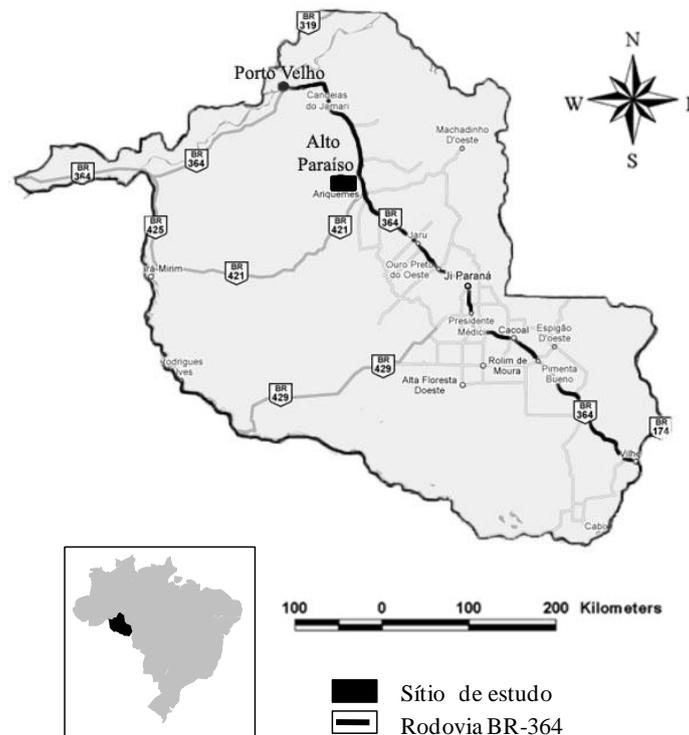


Fonte: <http://maps.google.com.br/maps?hl=pt-BR&tab=wl&q=o>

5.1.2. Município de Alto Paraíso, Rondônia

O município de Alto Paraíso (09°42'47" S e 63°19'15" O) possui uma área de 2.651,81 km² e está inserido no bioma Amazônia. Localizado no estado de Rondônia, na mesorregião Leste Rondoniense e microrregião Ariquemes; dista 211 km da capital Porto Velho com acesso pela rodovia BR-364. Possui 17.144 habitantes, dos quais 8.928 pertencem à zona rural (IBGE, 2010). A pecuária, a produção agrícola voltada para cereais, leguminosas e oleaginosas, a extração vegetal e a silvicultura são as principais atividades econômicas do município. (<http://www.ferias.tur.br/informacoes/7313/alto-paraiso-ro.html>) (Figura 7).

Figura 7 - Mapa mostrando a localização do município Alto Paraíso, no estado de Rondônia, ligado à capital Porto velho pela Rodovia BR-364.

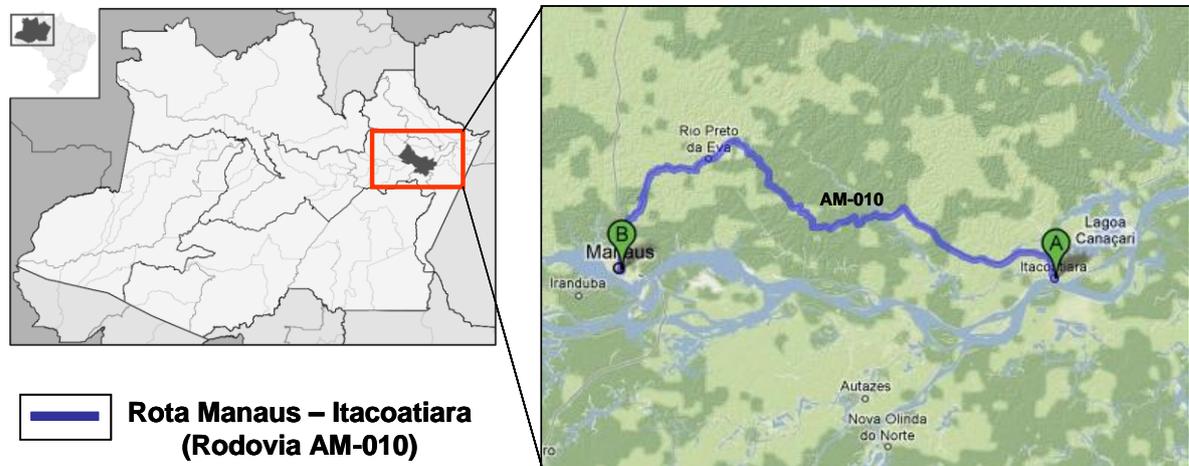


Fonte: Adaptado de <http://www.transportes.gov.br/bit/mapas/mapclick/ufs/ro.jpg>.

5.1.3. Município de Itacoatiara, Amazonas

O município de Itacoatiara ($3^{\circ} 8'31.37''S$ / $58^{\circ}26'33.14''O$) está localizado na margem esquerda do rio Amazonas, a 266 Km de Manaus pela Rodovia AM-010 (Figura 8). Situa-se no bioma amazônico e possui um clima tropical, chuvoso e úmido. Pertence à mesorregião Amazonas Centro e microrregião Itacoatiara, possuindo uma população de 86.840 habitantes, dos quais 28.665 pessoas vivem na área rural (IBGE, 2010). No município predominam as culturas temporárias de cana-de-açúcar feijão, malva, mandioca e milho, sendo a pecuária para a criação de bovinos e suínos, bastante significativa em termos econômicos. No que se refere a culturas permanentes destacam-se cacau, café, coco, laranja, guaraná, mamão e limão.

Figura 8 - Mapa mostrando a localização do município de Itacoatiara, no estado do Amazonas, ligado à Manaus pela rodovia AM - 010.



Fonte: Adaptado de <http://maps.google.com.br/maps?hl=pt-BR&tab=wl&q=o>

5.1.4 Campo Novo do Parecis e Tangará da Serra, Mato Grosso

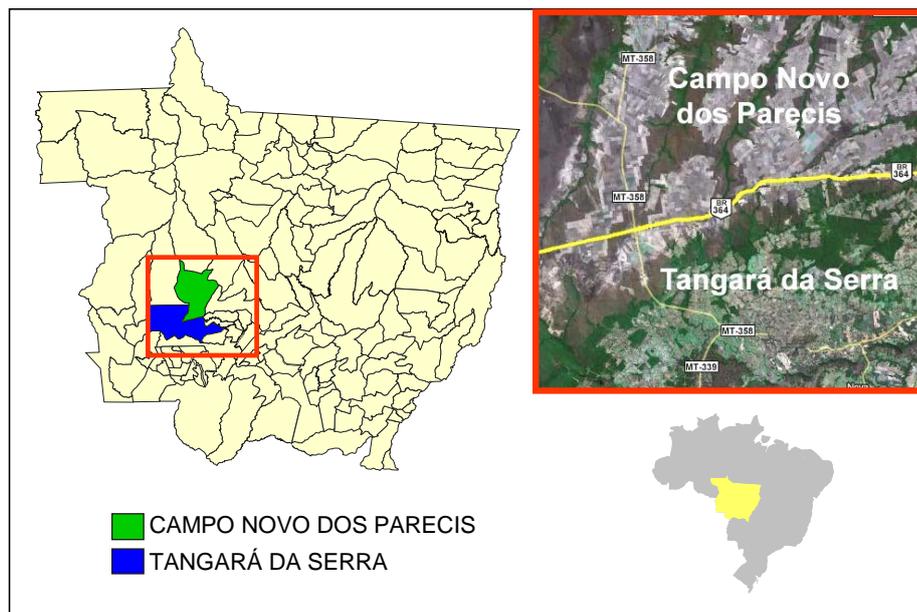
Os municípios de Campo Novo do Parecis e Tangará da Serra, no estado do Mato Grosso, fazem parte da área de influência da BR-364, rodovia federal que liga Cuiabá a Porto Velho e Rio Branco, passando nas microrregiões norte e sudoeste da porção oeste do Mato Grosso. A implantação da rodovia gerou grandes impactos ambientais na região, inclusive nas populações indígenas, alterando o ecossistema local (SILVA, 2000).

O município de Campo Novo do Parecis ($13^{\circ}40'31''$ S e $57^{\circ}53'31''$ O) localiza-se no Médio Norte mato-grossense (Figura 9), abrangendo o Chapadão do Parecis e três reservas indígenas, cuja população é de aproximadamente 500 índios. A vegetação é formada, predominantemente, de cerrados e matas pré-amazônicas, possuindo um clima tropical, que favorece as culturas de grãos, aveia, centeio, cevada, feijão, girassol, soja, milho, sorgo, trigo, triticale, além de algodão arbóreo e herbáceo (em caroço), amendoim e arroz (em casca) (DUBREUIL, 2005; IBGE, 2010).

O município de Tangará da Serra ($14^{\circ}37'10''$ S e $57^{\circ}29'09''$ O), também se localiza na região sudoeste do estado do Mato Grosso (Figura 9), conhecida como Médio Norte, cuja vegetação exhibe matas densas nas encostas e no alto da Serra de

Tapirapuã e cerrado no alto da Serra dos Parecis. Possui um clima tropical chuvoso, quente e úmido, com dois períodos bem definidos: chuvas entre setembro e abril, e estiagem entre maio e agosto. As culturas de algodão, arroz, feijão, milho, soja, cana-de-açúcar e abacaxi são predominantes (DUBREUIL, 2005; IBGE, 2010).

Figura 9 - Mapa mostrando a localização dos municípios de Campo Novo do Parecis e Tangará da Serra, no estado do Mato Grosso, ao longo da Rodovia BR -364 (linha amarela).



Fonte: Adaptado de <http://maps.google.com.br/maps?hl=pt-BR&tab=wl&q=o>.

5.1.5 Município de Tomé-Açu, Pará

O município de Tomé-Açu (02°25'08" S e 48°09'08" O) está localizado no nordeste do estado do Pará a 113 km da capital Belém, possuindo 56.518 habitantes, dos quais 24.955 pessoas vivem na zona rural (Figura 10) (IBGE, 2010). O município é cortado pela rodovia PA-140 (Santa Izabel a Tomé-Açu) e caracterizado pela cultura da pimenta do reino, elevando o Brasil, à condição de produtor mundial (<http://www.ferias.tur.br/informacoes/4820/tome-acu-pa.html>).

Figura 10 - Município de Tomé-Açu, localizado no estado do Pará, distante 113 km da capital Belém.



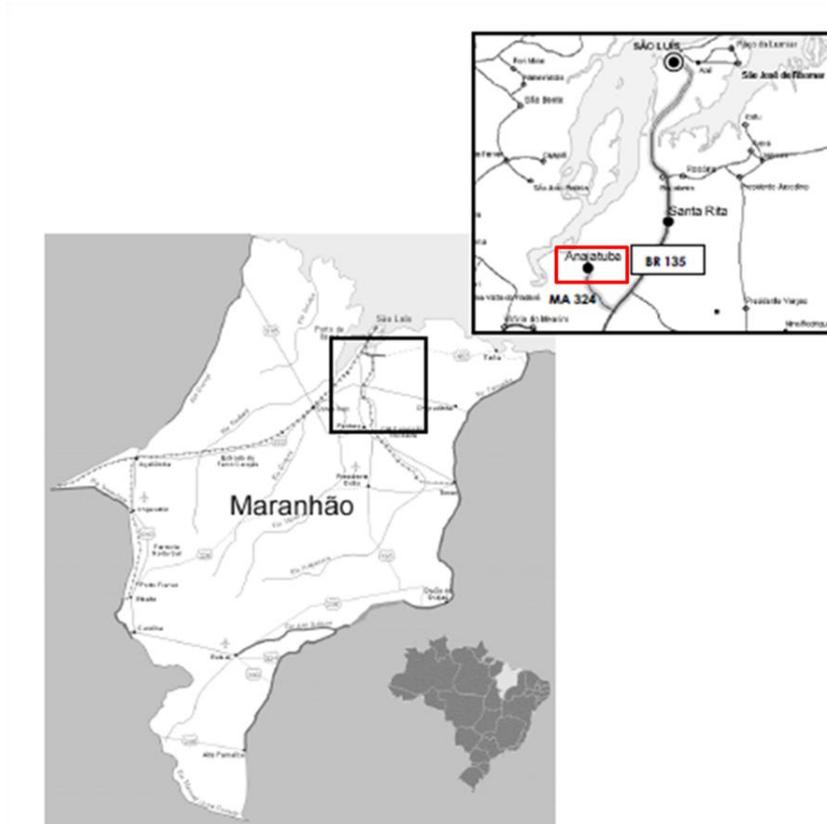
Fonte: Adaptado de <http://maps.google.com.br/maps?hl=pt-BR&tab=wl&q=0>.

5.1.6 Município de Anajatuba, Maranhão

O Município de Anajatuba (03°16' S, 44°37' O) está localizado na baixada ocidental maranhense pertencendo à microrregião de alagado do rio Maranhão, no estado do Maranhão. Apresenta uma área territorial de 331.935,507 km², onde residem 6.574.789 habitantes (IBGE, 2010). Esse Município dista 135 km, em direção sul, da capital São Luís, com acesso principal pela rodovia federal BR-135 e rodovia estadual MA-324 (Figura 11). A região, conhecida como Baixada Maranhense, é formada por cadeias de lagoas com extensos pântanos e campos inundados, sendo que neste município observam-se áreas de floresta e extensos campos de arroz, inclusive aos arredores da zona urbana. O clima da região é tropical úmido com temperatura média variando entre 26 °C e 28 °C, cujo período chuvoso estende-se entre os meses de janeiro a julho. O poder aquisitivo da população é de baixa renda e a economia é baseada na criação de gado, pesca e

plântio de mandioca, arroz, cana-de-açúcar e milho (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2005; MENDES et al., 2001).

Figura 11 - Município de Anajatuba, no estado do Maranhão.



Fonte: Adaptado de TRAVASSOS DA ROSA, 2008.

5.2 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS PARA AS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

5.2.1 Amostras de Roedores

Para a caracterização genética de hantavírus, foram utilizados como critérios de seleção, roedores silvestres apresentando anticorpos IgG anti-hantavírus, assim como roedores que tiveram resultados sorológicos indeterminados, através do ELISA, que é o método de triagem para posterior detecção do genoma viral, baseado no protocolo estabelecido por Thomas G. Ksiazek (CDC/Atlanta) (ZÖLLER et al., 1993). Os roedores foram capturados em

investigações ecoepidemiológicas realizadas por equipes compostas por técnicos do IEC e secretarias estaduais de saúde dos estados do Amazonas (SES/AM), Rondônia (SES/RO) e Mato Grosso (SES/MT), bem como pela Equipe Nacional de Hantavírus

Dos 11 espécimes capturados em Itacoatiara/AM, quatro foram reagentes no teste de ELISA para detecção de IgG e dos 140 espécimes capturados em Alto Paraíso/RO, 19 foram reagentes e um indeterminado. Para o presente estudo foram testados, por técnicas de biologia molecular, fragmentos de vísceras dos 19 roedores positivos e um com resultado indeterminado por sorologia, capturados em Rondônia e dos quatro roedores provenientes do estado do Amazonas, todos pertencentes à espécie *Oligoryzomys microtis* (Quadro 2).

Também foi utilizada uma amostra de roedor *Oligoryzomys utiaritensis* procedente de Campo Novo do Parecis/MT, positiva para anticorpos IgG e que foi sequenciada parcialmente em estudo anterior (TRAVASSOS DA ROSA, 2008). Esta amostra foi proveniente do projeto realizado no período de 2006 a 2008, intitulado “Dinâmica populacional de roedores silvestres e o grau de infecção por hantavírus na Microrregião do Médio Norte do Estado de Mato Grosso”, coordenado pela SVS e Secretaria Municipal de Campo Novo do Parecis (Quadro 2).

Esses estudos foram desenvolvidos após consulta e autorização prévia junto ao IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e segundo as Normas de Biossegurança de Nível III preconizadas pelo Ministério da Saúde do Brasil, logo após a notificação de casos de SPH nos referidos estados.

Quadro 2 - Amostras de roedores silvestres capturados em Rondônia, Amazonas e Mato Grosso, previamente selecionadas pelo ELISA IgG.

REGISTRO DA AMOSTRA	Nº CAMPO	AMOSTRA BIOLÓGICA	PROCEDÊNCIA	UF	ANO
AN 693783	RO19616	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693787	RO19620	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693789	RO19622	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693791	RO19624	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693799	RO19632	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693800	RO19633	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693240	RO19633	Fígado	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693242	RO19635	Fígado	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693802	RO19635	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693804	RO19637	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693244	RO19637	Fígado	Alto Paraíso	RO	2005
AN 393807	RO19640	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693247	RO19640	Fígado	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693808	RO19641	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693248	RO19641	Fígado	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693811	RO19644	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693251	RO19644	Fígado	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693822	RO19655	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693262	RO19655	Fígado	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693829	RO19662	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693269	RO19662	Fígado	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693837	RO19670	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693277	RO19670	Fígado	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693848	RO19681	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693288	RO19681	Fígado	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693852	RO19685	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693292	RO19685	Fígado	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693857	RO19690	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693297	RO19690	Fígado	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693867	RO19700	Pulmão	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693307	RO19700	Fígado	Alto Paraíso	RO	2005
AN 693777	RO19750	Coração	Alto Paraíso	RO	2005
AN 683346	RO19445	Pulmão	Itacoatiara	AM	2004
AN 683313	RO19445	Fígado	Itacoatiara	AM	2004
AN 683335	RO19445	Rim-coração	Itacoatiara	AM	2004
AN 683336	RO19446	Rim-coração	Itacoatiara	AM	2004
AN 683314	RO19446	Fígado	Itacoatiara	AM	2004
AN 683338	RO19448	Rim-coração	Itacoatiara	AM	2004
AN 683316	RO19448	Fígado	Itacoatiara	AM	2004
AN 683318	RO19450	Fígado	Itacoatiara	AM	2004
AN 683340	RO19450	Rim-coração	Itacoatiara	AM	2004
AN 717313	RO20351	Pulmão	CNP	MT	2006

Legenda: Em vermelho roedor IgG indeterminado; CNP= Campo Novo do Parecis.

5.2.2 Amostras de Humanos

Amostras de soro e sangue de nove pacientes clinicamente suspeitos de SPH com confirmação por sorologia (IgM positivos) foram selecionadas, além de uma amostra de *pool* de vísceras de caso de óbito proveniente do Maranhão (Quadro 3).

Sete dessas amostras foram selecionadas de municípios e distritos de municípios localizados ao longo do eixo da rodovia Cuiabá-Santarém (BR-163) e são provenientes do projeto intitulado “Avaliação ambiental e soroe epidemiologia das infecções causadas por arbovirus e hantavirus em humanos e roedores em áreas de influência da BR - 163 (rodovia Cuiabá-Santarém)”, realizado no período de 2005 a 2006. As amostras foram provenientes dos municípios de Novo Progresso e as cidades Castelo dos Sonhos e Cachoeira da Serra, distritos do município de Altamira, no estado do Pará e município de Guarantã do Norte, no Mato Grosso. Estas amostras foram enviadas ao Instituto Evandro Chagas pelas secretarias Municipais e Estaduais de Saúde dos respectivos estados, no período de 2006 a 2008.

Quadro 3 - Amostras humanas de casos confirmados de SPH, de acordo com o espécime biológico, sua localidade de origem e ano de coleta.

UF	ANO	Nº DE CAMPO	REGISTRO	AMOSTRA BIOLÓGICA	MUNICÍPIO/DISTRITO
PA	2006	MTO5550	H708928*	Soro	Novo Progresso
PA	2008	NPO955	H745332*	Sangue	Novo Progresso
PA	2006	MTO5747	H714214*	Soro	Altamira/Castelo dos Sonhos
PA	2005	ALT18527	H695323*	Soro	Altamira/Castelo dos Sonhos
PA	2006	ALT18542	H700306*	Soro	Altamira/Castelo dos Sonhos
PA	2006	MTO5665	H712177*	Soro	Altamira/Cachoeira da Serra
PA	2009	TA1487	H756121	Sangue/Soro	Tomé- Açú
MT	2006	MTO6444	H716591*	Soro	Guarantã do Norte
MT	2007	MTO7102	H731172	Sangue	Tangará da Serra
MA	2009	MÃO12826	H759113	<i>Pool</i> de vísceras	Anajatuba

Legenda: em asterisco (*) as amostras provenientes dos municípios da área de influência da BR-163.

5.3 DETECÇÃO PARCIAL DO GENOMA VIRAL

As vísceras - pulmão, rim, coração e fígado - dos roedores selecionados e *pool* de vísceras de um caso humano foram maceradas em solução salina tamponada (PBS), pH 7,4, na proporção de 1:5 e centrifugadas a 13.000rpm por dez minutos e, juntamente às amostras de sangue e soro de humanos, foram submetidas à extração do RNA viral utilizando o kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), composto por: tampão AVL, AW1, AW2 e AVE.

A microtubos de 1,5ml previamente identificados foram adicionados 560µL do tampão AVL juntamente a 140µl das amostras, misturando-as e incubando a 15-25°C por dez minutos. Em seguida, adicionou-se 560µl de etanol (96-100%). Essa mistura foi passada para uma coluna de sílica acoplada a um tubo coletor de 2ml, onde foi centrifugada a 8000rpm por um minuto, sendo descartado o conteúdo do tubo coletor e repetindo-se esse passo para retirar os resquícios de etanol da coluna. Adicionou-se 500µl de tampão AW1, centrifugando-se a 8000rpm por um minuto e trocando o tubo coletor por um novo. Em seguida foi adicionado 500µl de tampão AW2 e submeteu-se à centrifugação a 14000rpm por três minutos. Os tubos coletores foram descartados e substituídos por microtubos de 1,5ml que receberam as colunas de sílica, adicionando-se 40µl de tampão de eluição (AVE) logo em seguida. Após uma centrifugação de 8000rpm por um minuto o RNA foi recuperado das colunas para dentro dos microtubos, sendo estocado, posteriormente, a - 70°C para fins de conservação até o uso.

A detecção do genoma viral a partir de amostras biológicas dos roedores silvestres foi realizada em três etapas: a primeira pela técnica de Transcrição Reversa (RT) para a produção de um DNA complementar (cDNA) ao RNA viral; a segunda empregando a técnica de PCR para amplificação do cDNA; e a terceira correspondeu a um Hemi-Nested-PCR para aumentar a sensibilidade da reação. Nesse caso, foram utilizados iniciadores degenerados (Quadro 4) para hantavírus associados com roedores da subfamília Sigmondontinae (JOHNSON et al., 1997) capazes de amplificarem parcialmente o segmento S que codifica a proteína de Nucleocapsídeo (N). Para as amostras provenientes de humanos a terceira etapa correspondeu a uma reação de Nested-PCR modificando apenas um dos iniciadores, como mostrado no quadro 4.

Quadro 4 - Iniciadores degenerados utilizados para a amplificação parcial do segmento S, na técnica de Nested-RT-PCR para amostras provenientes de humanos e Hemi-Nested-RT-PCR para amostras provenientes de roedores silvestres.

INICIADOR	SEQUÊNCIA (5' → 3')	POSIÇÃO NO GENOMA (nt)	PRODUTO ESPERADO (pb)	ETAPA	ESPÉCIME BIOLÓGICO
SS143C (F05)	TGGIICCIGATGAIGTTAACAAC	143+	573	RT/PCR	ROEDOR
PPT716R* (F08)	AAICCIATIACICCCAT	716-		PCR	
SS283C (F07)	CCAACIGGGITTGAICCCIGATA	283+	434	Hemi-Nested-PCR	
PPT716R* (F08)	AAICCIATIACICCCAT	716-		Hemi-Nested-PCR	
SS143C (F05)	TGGIICCIGATGAIGTTAACAAC	143+	927	RT/PCR	HUMANO
SS1070R (F06)	GCCATIGTITTICTCAT	1070-		PCR	
SS283C (F07)	CCAACIGGGITTGAICCCIGATA	283+	433	Nested-PCR	
PPT716R (F08)	AAICCIATIACICCCAT	716-		Nested-PCR	

Fonte: JOHNSON et al., 1997.

Legenda: Asterisco (*) refere-se à conservação do iniciador reverso nas duas etapas (PCR e Hemi-Nested-PCR); nt = nucleotídeos; I = inosina.

O volume de 2,5µl de RNA viral foi inicialmente submetido à desnaturação, a 94°C por cinco minutos, seguido da reação de RT, composta por: tampão para RT (1x – 250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ - Invitrogen); DTT (1 mM – 0,01% (v/v) NP-40, 50% (v/v) glicerol - Invitrogen); dNTPs (0,5 mM); inibidor de RNase (0,4 U/µL, Invitrogen); iniciador senso da RT- SS143C (F05) (1 µM); transcriptase reversa (100 U - Superscript III, Invitrogen); e água livre de DNase e RNase (Invitrogen). A reação foi ajustada para o volume final de 10µl utilizando um ciclo a 42°C por 90 minutos foi realizado em termociclador automático (Mastercycler gradient, Eppendorf).

Os produtos de RT foram usados na reação de PCR com volume ajustado para 25 µl, contendo 5 µl de cDNA e 20 µl da mistura de PCR constituída de: tampão para PCR (1x – 250 mM Tris-HCl pH 8.3, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA); cloreto de magnésio (1,5 mM), dNTP's (0,2 mM); iniciadores para PCR degenerados (0,2 µM) conforme descrito na tabela 3; a enzima Platinum TAQ Polimerase (2,5 U, Invitrogen) e água livre de DNase e RNase. A amplificação foi realizada em 35 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 94°C por 1 minuto,

anelamento dos iniciadores a 45°C por 1 minuto e síntese a 72°C durante 2 minutos, finalizando com a extensão a 72°C por 10 minutos.

As etapas de Hemi-Nested-PCR e Nested-PCR foram realizadas seguindo o mesmo protocolo da PCR, sendo neste caso usado um volume de 10 µl de cDNA e os iniciadores apropriados para a etapa e o tipo de amostra, com ajuste de volume final para 50 µl.

5.4 SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO PARCIAL

Quatro microlitros obtidos após as etapas da PCR foram utilizados para a análise pelo método de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, imerso em tampão TAE (1x), utilizando aparato de eletroforese convencional, e corado com SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen). Os amplicons de aproximadamente 434pb foram visualizados em transiluminador com emissão de raios UV, comparados ao padrão de peso molecular Low DNA Mass Leader (Invitrogen) e em seguida, fotografados para documentação e registro.

A purificação dos produtos finais dessas etapas foi realizada seguindo o protocolo do fabricante do kit comercial GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) em gel de agarose Low Melt 1% (Sigma). Os amplicons foram inicialmente destacados do gel, após a visualização em luz UV e inseridos em diferentes microtubos com capacidade de 1,5 mL, previamente identificados com o número das amostras, seguindo-se a etapa da pesagem com o auxílio de uma balança analítica e posterior purificação usando o kit comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE healthcare) e seguindo-se o protocolo do fabricante.

Posteriormente, o sequenciamento dos cDNAs purificados foi realizado empregando as plataformas ABI PRISM 377 e ABI 3130 (Applied Biosystems), através do Kit ABI PRISM BigDye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems), que emprega o método de terminação de cadeia por didesoxiribonucleotídeos (SANGER et al., 1977) marcados com diferentes fluoróforos para cada nucleotídeo na extremidade 3'.

5.4.1 Método de Sanger

a) ABI PRISM 377(Applied Biosystems): na reação de sequenciamento foram utilizados 4µl de *Terminator ready reaction mix* (Applied Biosystems), 2 µL (80ng) do produto de PCR purificado e 3,2 pmoles de oligonucleotídeos, ajustados com água livre de RNase e DNase para um volume final de 10µl. A amplificação foi realizada em termociclador (GeneAmp PCR Systems 9600, Applied Biosystems), usando um programa específico que consiste de 25 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento dos iniciadores a 50°C por 5 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

O produto final foi precipitado com a adição de 80 µl de isopropanol 75% (álcool isopropílico, Merck). A mistura foi agitada, incubada por 20 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 14.000rpm por 25 minutos. Ao final, o sobrenadante foi retirado e desprezado, e em seguida o precipitado foi lavado com 250µL de etanol a 70% e centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi incubado a 90°C por 2 minutos para a completa evaporação do etanol. O precipitado foi então reconstituído em 5µl de solução de formamida deionizada (Amresco), na proporção de 5:1 com azul dextran/EDTA (Applied Biosystems), aquecido a 95 °C por 3 minutos e submetido à eletroforese no sequenciador automático.

b) ABI 3130 (Applied Biosystems): a reação de sequenciamento consistiu em: 5µL de *Terminator ready reaction mix* (Applied Biosystems); 0,5-5,0 µL (30-50ng) do produto de PCR; 3,2pmol de oligonucleotídeos iniciadores e quantidade suficiente de água para um volume final de 20µL. A amplificação foi realizada para 25 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 96°C por 10 segundos, hibridização dos iniciadores a temperatura de 45°C por 5 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos.

A precipitação foi realizada com a adição de 5µl de EDTA (125 mM) seguido de 60µl de etanol absoluto. A mistura foi agitada, incubada a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugada a 14.000g por 45 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e em seguida o precipitado foi lavado com 60µl de etanol a 70%, sendo centrifugado por 15 minutos a 14.000g. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi mantido a temperatura ambiente até a evaporação completa do etanol

e após isto, foi ressuspensionado com 10µl de formamida Hi-DI (Applied Biosystems), aquecido a 95 °C por 5 minutos e submetido à eletroforese no sequenciador automático de capilar ABI PRISM 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

5.5 SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO COMPLETO DO GENE N, S-RNA POR PIROSEQUENCIAMENTO

Alternativamente, foi realizado o pirosequenciamento pelo GFS FLX genome sequencer 454 (Life Science, Roche) em parceria com a Universidade de Columbia (Nova Iorque, EUA) para obter as sequências completas dos hantavírus em estudo, desenvolvido em quatro etapas: i) Preparação de biblioteca genômica (**Figura 12a**); ii) Amplificação clonal baseada em emulsão (emPCR) da biblioteca genômica (**Figura 12b**); iii) sequenciamento conforme descrito no manual de instrução (**Figura 12c**); iv) análise computacional.

i) A biblioteca genômica foi construída a partir da fragmentação por cloreto de zinco, no qual pequenos fragmentos entre 400 e 600 nucleotídeos foram produzidos e utilizando iniciadores adaptadores universais (iniciadores randômicos). Em seguida, as bibliotecas foram construídas empregando o kit de preparação de bibliotecas genômicas (fragment cDNA library kit, Roche), nas quais enzimas contidas no kit promovem a ligação de adaptadores aos fragmentos de cDNA amplificados e sequenciados com iniciadores complementares.

ii) Para a emPCR, foi utilizado o kit emPCR (Life Science, Roche). As bibliotecas de cDNA foram postas em contato com esferas magnéticas (*beads*) de captura requeridas durante a etapa de sequenciamento e que facilitam a detecção dos fragmentos. O cDNA juntamente com as enzimas e as esferas de captura foram embebidas em água e injetadas no interior de pequenos depósitos cilíndricos contendo óleo sintético. A combinação destes reagentes e a vigorosa agitação dos mesmos produzem a emulsão (pequenas gotas ao redor das esferas, chamados de microreatores). Cada microreator contém um fragmento de DNA que foi isoladamente amplificado por PCR, produzindo milhões de cópias, e posteriormente, imobilizadas nas esferas de captura. Ao final da reação de PCR, as esferas (*beads*) que não continham os fragmentos de DNA foram eliminadas, ao passo que as que apresentaram DNA amplificado foram retidas e utilizadas para a etapa de processamento e leitura do sinal de sequenciamento.

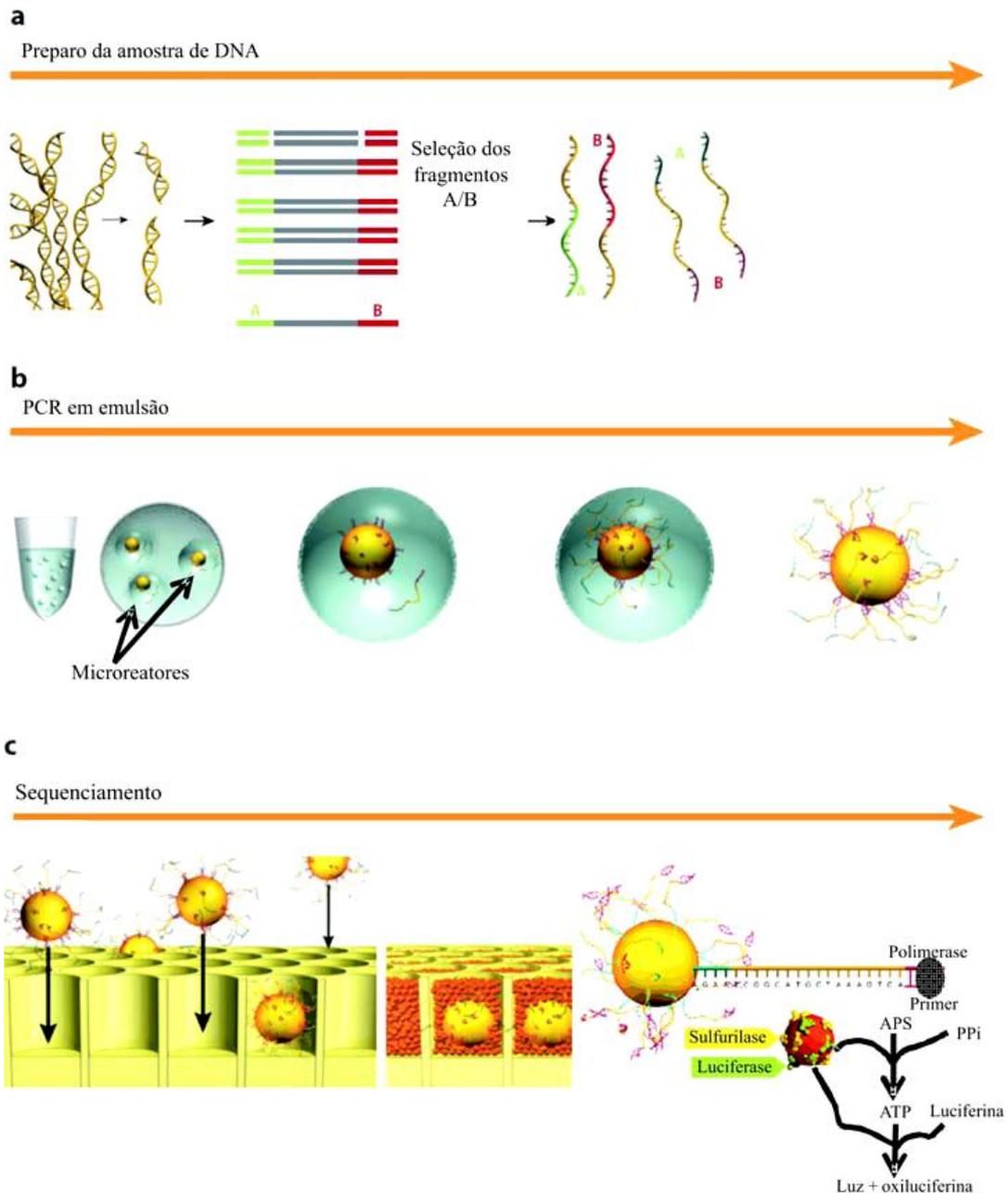
iii) O DNA amplificado nas esferas de captura foi alocado no interior do aparelho *PicoTiterPlate* de modo que cada orifício da placa permitiu a inclusão de apenas uma esfera de captura. Posteriormente, a placa foi inserida no sequenciador FLX Titanium 454 (Life Science, Roche).

iv) As sequências obtidas foram inicialmente avaliadas quanto à qualidade pelo programa Phred (EWING E GREEN, 1998). Também foi utilizado um pré-processo de análise onde as *reads* (pequenas sequências de DNA geradas pelo sequenciador) foram confrontadas contra um banco de dados contendo sequências de hospedeiros para uma triagem inicial e retirada de sequências inespecíficas, objetivando aumentar a confiabilidade da montagem. Em seguida, foi feita a montagem das sequências pelo método *De Novo*, utilizando o programa GS De Novo Assembler (gsAssembler), implementado no programa Newbler v. 2.5.3 (<http://www.454.com/>) como algoritmo de montagem.

Alternativamente, os genomas foram montados utilizando os programas Mira 3 (http://www.chevreux.org/projects_mira.html), Euler (PEVZNER et al., 2001) e Amos (<http://sourceforge.net/apps/mediawiki/amos/index.php>). A validação do genoma foi feita mediante comparação entre os fragmentos montados (*contigs*), sendo escolhido aquele que apresentou maior valor de confiabilidade e com a maior incorporação de leituras (*reads*).

Independente do programa usado para montagem, o genoma final obtido (*contig*) foi visualizado pelo programa Tablet (<http://bioinf.scri.ac.uk/tablet/>) e, posteriormente, confrontado com sequências disponíveis no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificação empregando o programa *BLAST search* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). A anotação genômica e identificação de ORFs, regiões não-codificantes e produtos genômicos foi realizada com auxílio do programa Geneious pro TM 5.4 (<http://www.geneious.com/>) e InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/tools/pfa/iprscan/>).

Figura 12 - Resumo ilustrativo do sequenciamento de DNA na plataforma do GFS FLX Genome Sequencer 454: a) Preparação das bibliotecas; b) PCR em emulsão e c) Sequenciamento. (a) O DNA é fragmentado e ligado à adaptadores A e B nas suas extremidades. (b) Os fragmentos são ligados às microesferas magnéticas que são capturadas individualmente em gotículas oleosas onde a PCR em emulsão ocorre. (c) As microesferas ligadas às sequências alvo são capturadas individualmente em poços no suporte do sequenciamento. São fornecidos os reagentes para a reação de pirosequenciamento e o sinal de luz emitido é identificado a cada base incorporada, em cada poço do sequenciamento.



Fonte: <http://454.com/index.asp>.

5.6 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências nucleotídicas parciais e completas obtidas foram analisadas inicialmente pelo programa *BLAST search*, disponível no portal do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), utilizando como critério de significância o *e-value*. Em seguida, foram alinhadas e comparadas entre si e com outras sequências nucleotídicas de hantavírus disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o programa Clustal W (THOMPSON et al., 1997), implementado pelo programa BioEdit versão 5.0 (HALL, 2001), e ajustadas manualmente.

As árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de agrupamento de vizinhos (*Neighbor Joining*, NJ) e máxima parcimônia (MP), implementados no programa PAUP 4.0b.10 (SWOFFORD, 2002), bem como o método de máxima verossimilhança (MV), utilizando o programa PHYML (GUINDON e GASCUEL, 2003) e Bayesiano, implementado pelo programa MrBayes versão 3 (RONQUIST E HUELSENBECK, 2003).

Foram utilizadas sequências pertencentes a cinco grupos principais de hantavírus filogeneticamente relacionados aos seus roedores hospedeiros: Sigmodontíneos; Arvicolíneos; Muríneos; Soricíneos e Crociduríneos (Quadro 5). O grupo dos Crociduríneos, representado pelos *virus Thottapalayam* (VTPM) e *virus Imijin* (VMJN) foi usado como grupo externo por apresentarem maior divergência com os demais hantavírus.

Quadro 5 - Sequências parciais e completas dos hantavírus utilizadas na reconstrução filogenética do segmento S, gene N das amostras obtidas no estudo e código de acesso para o GenBank.

CEPA	ESPÉCIE VIRAL	SIGLA	ISOLADO DE	GENBANK	LOCALIDADE	TIPO DE SEQUÊNCIA
Vírus <i>Andes</i> cepa CHI-7913	<i>Andes</i>	VAND	<i>Homo sapiens</i>	AY228237	Chile	Completa
Vírus <i>Andes</i> cepa Chile-717869	<i>Andes</i>	VAND	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	AF291702	Chile	Completa e Parcial
Vírus <i>Amur</i> cepa JilinAP06	<i>Amur</i>	VAMR	<i>Apodemus peninsulae</i>	EF121324	China	Completa e Parcial
Vírus <i>Araucária</i> cepa HPR/04-102	<i>Juquitiba</i>	VJUQ	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	AY740633	Brazil	Completa e Parcial
Vírus <i>Asama</i> cepa N9	<i>Asama</i>	VASA	<i>Urotrichus talpoides</i>	EU929071	Japão	Completa e Parcial
Vírus <i>Araraquara-like</i> cepa P5/Cajuru	<i>Araraquara</i>	VARA	(<i>Necromys lasiurus</i> , antigamente <i>Bolomys lasiurus</i>)	EF571895	Brasil	Completa e Parcial
Vírus <i>Anajatuba</i>	<i>Anajatuba</i>	VANAJ	<i>Oligoryzomys fornesi</i>	DQ451829	Brasil	Parcial
Vírus <i>Alto Paraguay</i>	<i>Alto Paraguay</i>	VAP	<i>Holochilus chacarius</i>	DQ345762	Paraguai	Parcial
Vírus <i>Bermejo</i>	<i>Bermejo</i>	VBMJ	<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	AF482713	Argentina	Parcial
Vírus <i>Black Creek Canal</i>	<i>Black Creek Canal</i>	VBCC	<i>Sigmodon hispidus</i>	L39949	EUA	Parcial
Vírus <i>Bayou</i>	<i>Bayou</i>	VBAY	Paciente de Louisiana com SPH (hospedeiro natural <i>Oryzomys palustris</i>)	L36929	EUA	Completa e Parcial
Cepa <i>Jurong</i> TJK/06(RT49)	<i>Serang</i>		<i>Rattus tanezumi</i>	GQ274940	Cingapura	Completa e Parcial
Vírus <i>Cano Delgadito</i> cepa H-574	<i>Cano Delgadito</i>	VCAD	<i>Sigmodon alstoni</i>	DQ285566	Venezuela	Completa e Parcial
Vírus <i>Cao Bang</i> cepa 3	<i>Cao Bang</i>	VCBN	<i>Anourosorex squamipes</i>	EF543524	Vietnã	Completa
Cepa <i>Itapuã</i> 38	<i>Itapuã</i>		<i>Oligoryzomys nigripes</i>	DQ345766	Paraguai	Completa e Parcial
Vírus <i>Castelo dos Sonhos</i>	<i>Castelo dos Sonhos</i>	VCAS	<i>Soro de paciente na fase aguda</i>	AF307324	Brasil	Parcial
Vírus <i>Choclo</i>	<i>Choclo</i>	VCHO	<i>Oligoryzomys fulescens</i>	DQ285046	Panamá	Parcial
Vírus <i>Dobraava-Belgrade</i> isolado 3970/87	<i>Dobraava-Belgrade</i>	VDOB	<i>Apodemus flavicollis</i>	L41916	Eslovênia	Completa e Parcial
Vírus <i>El Moro Canyon</i> isolado RM-97	<i>El Moro Canyon</i>	VELMC	<i>Reithrodontomys megalotis</i>	U11427	EUA	Completa e Parcial
Vírus <i>Hantaan</i> cepa ZLS6-11	<i>Hantaan</i>	VHTN	<i>Apodemus agrarius</i>	FJ753396	China	Completa e Parcial
Vírus <i>Imjin</i> cepa CI 04-55	<i>Imjin</i>	VMJN	<i>Crocidura lasiura</i>	EF641805	Coréia do Sul	Completa e Parcial
Vírus <i>Isla vista</i> MC-SB-47	<i>Isla vista</i>	VISLA	<i>Microtus californicus</i>	U19302	EUA	Completa e Parcial
Vírus <i>Khabarovsk</i> isolado MF-43	<i>Khabarovsk</i>	VKHA	<i>Microtus fortis</i>	U35255	Rússia	Completa e Parcial
Vírus <i>Kenkeme</i> isolado SB148794	<i>Kenkeme</i>	VKKM	<i>Sorex roboratus</i>	GQ306148	Rússia	Completa e Parcial
Vírus <i>Liu</i>	<i>Liu</i>	VLIU	Isolado de soro de paciente	AF288649	China	Completa e Parcial

Vírus <i>Laguna Negra</i>	<i>Laguna Negra</i>	VLN	<i>Calomys laucha</i>	AF005727	Paraguai e Bolívia	Completa e Parcial
Vírus <i>Lechiguanas</i>	<i>Lechiguanas</i>	VLEC	<i>Oligoryzomys flaescens</i>	AF482714	Argentina	Parcial
Vírus <i>Muju</i> isolado 99-27	<i>Muju</i>	VMUJ	<i>Eothenomys regulus</i>	DQ138140	Coréia	Completa e Parcial
Vírus <i>Monongahela-1</i>	<i>Monongahela</i>	VMGL	<i>Peromyscus maniculatus</i>	U32591	EUA	Completa
Vírus <i>Muleshoe</i> cepa SH-Tx-339	<i>Muleshoe</i>	VMUL	<i>Sigmodon</i> spp. (<i>S. hispidus</i> ou <i>S. texensis</i>)	U54575	EUA	Completa e Parcial
Vírus <i>Maporal</i>	<i>Maporal</i>	VMAP	<i>Oligoryzomys fulescens</i>	AY267347	Venezuela	Completa e Parcial
Vírus <i>New York</i>	<i>New York</i>	VNY	<i>Pulmão de humano</i> (hospedeiro natural <i>Peromyscus leucopus</i>)	U09488	EUA	Parcial
Vírus <i>Oran</i>	<i>Oran</i>	VORN	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	AF482715	Argentina	Parcial
Vírus <i>Pergamino</i>	<i>Pergamino</i>	VPRN	<i>Akodon azarae</i>	AF482717.1	Argentina	Parcial
Vírus <i>Puumala</i> cepa P360	<i>Puumala</i>	PUUV	<i>Myodes glareolus</i> (anteriormente <i>Chletrionomys glareolus</i>)	L11347.1	Rússia	Completa e Parcial
Vírus <i>Prairie vole</i> MO46	<i>Prairie vole</i>	VPRA	<i>Microtus ochrogaster</i>	U19303	EUA	Completa e Parcial
Vírus <i>Prospect Hill</i>	<i>Prospect Hill</i>	VPH	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	M34011	EUA	Completa e Parcial
Vírus <i>Rio Mamoré</i> cepa HTN-007	<i>Rio Mamoré</i>	VRIOM	<i>Oligoryzomys microtis</i>	FJ532244	Peru	Completa e Parcial
Vírus <i>Rio Segundo</i> cepa RMx-Costa-1	<i>Rio Segundo</i>	VRIOS	<i>Reithrodontomys mexicanus</i>	U18100	México	Completa e Parcial
Vírus <i>Rio Mearim</i>	<i>Rio Mearim</i>	VRIME	<i>Holochilus sciureus</i>	DQ451828	Brasil	Parcial
Vírus <i>Sin Nombre</i> (isolado NM R11)	<i>Sin Nombre</i>	VSN	<i>Peromyscus maniculatus</i>	L37904	EUA	Completa e Parcial
Vírus <i>Shenyang-Mf-135</i>	<i>Shenyang</i>		<i>Microtus fortis</i>	FJ170797	China	Completa e Parcial
Vírus <i>Seoul</i>	<i>Seoul</i>	VSEO	<i>Mus noregicus albus</i>	EF536376	China	Completa e Parcial
Vírus <i>Tula</i> Sennickerode cepa Sen05/205	<i>Tula</i>	VTUL	<i>Microtus aralis</i>	EU439951	Alemanha	Completa e Parcial
Vírus <i>Thottapalayam</i>	<i>Thottapalayam</i>	VTPM	<i>Suncus murinus</i>	AY526097	Índia	Completa e Parcial
Vírus <i>Yakeshi</i> cepa Yakeshi-Mm-182	<i>Yakeshi</i>	-	<i>Microtus maximowiczii</i>	EU072484	China	Completa e Parcial
Vírus <i>Yuanjiang-Mf13</i>	<i>Yuanjiang</i>	-	<i>Microtus fortis</i>	FJ170795	China	Completa e Parcial

Fonte: Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>).

O programa Modeltest versão 3.7 (POSADA E CRANDALL, 1998) foi utilizado para determinar o melhor modelo de substituição nucleotídica a ser usado baseado no critério de informação Akaike (*Akaike Information Criterion*, AIC), com o auxílio do programa PAUP, versão 4 (SWOFFORD, 2002). Para os métodos de NJ e MV, as análises de *bootstrap* foram realizadas usando 1.000 pseudoréplicas (valor de confiabilidade de 95%) obtidas a partir do alinhamento original entre as sequências para a obtenção de resultados mais confiáveis (FELSENSTEIN et al., 1985).

A análise Bayesiana foi realizada empregando o modelo de Markov Monte Carlo (*Markov Chain Monte Carlo*, MCMC) e implementada no programa MrBayes

3.0b4, para dois milhões de réplicas, sendo a amostragem fixada para cada 1000 árvores geradas. Os valores Bayesianos foram estimados em 50% das árvores consenso geradas (HUELSENBECK E RONQUIST, 2001). O programa Tracer (www.evolve.zoo.ox.ac.uk) foi utilizado para verificar se a análise realizada pelo programa MrBayes alcançou a convergência apropriada.

5.7 DETERMINAÇÃO E ANÁLISE DE SIMILARIDADE (*BOOTSCANNING*) DAS REGIÕES CODIFICANTES

As ORFs das sequências nucleotídicas completas obtidas dos hantavírus amazônicos foram identificadas utilizando o programa Geneious versão 4.8.3 (www.geneious.com). Posteriormente, o programa SimPlot versão 3.5.1. (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCSoftware/simplot/>) foi empregado para examinar as sequências nucleotídicas dos hantavírus em estudo ao longo de toda a região codificante do gene N, S-RNA, bem como as sequências parciais, comparando-as a sequências de outros hantavírus previamente selecionados do GenBank. As análises filogenéticas pelo método de NJ foram obtidas para valores de *bootstrap* fixados em 1.000 réplicas, usando os programas SEQBOOT e DNAPARS (PHYLIP software versão 3.69) (FELSENSTEIN, 2009), utilizando o modelo de substituição nucleotídica (determinado pela disponibilidade do programa) Kimura 2 parâmetros e alternativamente F84. A análise foi repetida de 20 em 20 nt ao longo de todo o genoma. Os valores obtidos para *bootstrap* indicaram o grau de relação filogenética entre os vírus em estudo e outros hantavírus, sendo tabulados e plotados a cada etapa.

6 RESULTADOS

6.1 DETECÇÃO PARCIAL DO GENOMA DE HANTAVÍRUS

Dentre as amostras selecionadas foram obtidos amplicons utilizando os iniciadores degenerados de aproximadamente 434pb em 18 amostras provenientes de roedores silvestres, bem como de todas as amostras de humanos (Quadro 6).

Quadro 5 - Amostras amplificadas pelas técnicas de Hemi-Nested-PCR e Nested-PCR.

Nº DE CAMPO	REGISTRO	AMOSTRA BIOLÓGICA	ORIGEM	MUNICÍPIO/UF
RO19632	AN 693799	Pulmão	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Alto Paraíso/RO
RO19633	AN 693240	Fígado	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Alto Paraíso/RO
RO19635	AN 693802	Pulmão	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Alto Paraíso/RO
RO19637	AN 693804	Pulmão	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Alto Paraíso/RO
RO19640	AN 393807	Pulmão	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Alto Paraíso/RO
RO19670	AN 693837	Pulmão	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Alto Paraíso/RO
RO19681	AN 693848	Pulmão	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Alto Paraíso/RO
RO19690	AN 693857	Pulmão	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Alto Paraíso/RO
RO19700	AN 693867	Pulmão	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Alto Paraíso/RO
RO19445	AN 683346	Pulmão	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Itacoatiara/AM
RO19445	AN 683313	Fígado	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Itacoatiara/AM
RO19445	AN 683335	Rim-coração	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Itacoatiara/AM
RO19446	AN 683336	Rim-coração	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Itacoatiara/AM
RO19446	AN 683314	Fígado	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Itacoatiara/AM
RO19448	AN 683338	Rim-coração	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Itacoatiara/AM
RO19448	AN 683316	Fígado	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Itacoatiara/AM
RO19450	AN 683318	Fígado	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Itacoatiara/AM
RO19450	AN 683340	Rim-coração	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Itacoatiara/AM
MTO5550	H 708928	Soro	Caso Humano	Novo Progresso/PA
NPO955	H 745332	Sangue	Caso Humano	Novo Progresso/PA
MTO5747	H 714214	Soro	Caso Humano	Altamira/Castelo dos Sonhos/PA
ALT18527	H 695323	Soro	Caso Humano	Altamira/Castelo dos Sonhos/PA
ALT18542	H 700306	Soro	Caso Humano	Altamira/Castelo dos Sonhos/PA
MTO5665	H 712177	Soro	Caso Humano	Altamira/Cachoeira da Serra/PA
TA1487	H 756121	Sangue/Soro	Caso Humano	Tomé - Açú/PA
MTO6444	H 716591	Soro	Caso Humano	Guarantã do Norte/MT
MTO7102	H 731172	Sangue	Caso Humano	Tangará da Serra/MT
MÃO1826	H759113	Pool de vísceras	Caso Humano*	Anajatuba/MA

Legenda: asterisco (*) refere-se a caso de óbito notificado.

6.2 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

6.2.1 Sequências Parciais, gene N, S-RNA

Foram obtidas pelo método de SANGER et al., 1977 as sequências nucleotídicas parciais do gene N, segmento S, entre as posições 241 e 657, referente ao códon de iniciação do referido gene, apresentando aproximadamente 400 nucleotídeos (Tabela 1).

As sequências obtidas foram analisadas inicialmente pelo programa *BLAST search*, revelando diferentes graus de homologia com os hantavírus do Novo Mundo. De acordo com essa análise, as amostras de roedores silvestres procedentes de Alto Paraíso/RO e Itacoatiara/AM apresentaram maior identidade com o VRIOM. As amostras H756121 e H759113, procedentes do Pará (Tomé Açu) e Maranhão (Anajatuba), respectivamente, apresentaram maior identidade com o VANAJ, enquanto que as amostras procedentes de Altamira/PA (H712177, H695323, H700306, H714214), Novo Progresso/PA (H708928) e Garantã do Norte/MT (H716591) foram mais relacionadas ao VCAS (Tabela 1).

Tabela 1 - Amostras sequenciadas parcialmente pelo método de SANGER et al. 1977.

DADOS DAS AMOSTRAS					DADOS DO BLAST		
Registro	Hopedeiro	UF	Amostra Biológica	Hantavirus com maior identidade	Número de acesso	e-value	Percentual de identidade
AN 683314	<i>O. microtis</i>	AM	Fígado	VRIOM	U52136	2e-112	86 %
AN 683313	<i>O. microtis</i>	AM	Fígado	VRIOM	U52136	2e-112	86%
AN 693799	<i>O. microtis</i>	RO	Pulmão	VRIOM	U52136	3e-95	83%
AN 693240	<i>O. microtis</i>	RO	Fígado	VRIOM	U52136	1e-93	83%
AN 693802	<i>O. microtis</i>	RO	Pulmão	VRIOM	U52136	4e-94	83%
H 756121	Humano	PA	Soro/Sangue	VANAJ	HM238888	3e-179	96%
H 712177	Humano	PA	Soro	VCAS	AF307324	2e-162	94%
H 695323	Humano	PA	Soro	VCAS	AF307324	8e-166	94%
H 700306	Humano	PA	Soro	VCAS	AF307324	0.0	95%
H 714214	Humano	PA	Soro	VCAS	AF307324	3e-169	95%
H 708928	Humano	PA	Soro	VCAS	AF307324	1e-177	98%
H 716591	Humano	MT	Soro	VCAS	AF307324	0.0	99%
H 759113	Humano	MA	Pool de vísceras	VANAJ	DQ451829	0.0	98%

6.2.2 Sequências completas, gene N, S-RNA

Com a utilização da estratégia do pirosequenciamento foram obtidas as sequências completas referentes ao gene N, segmento S das amostras de três roedores: AN693269 e AN693292, procedentes de Alto Paraíso/RO, e AN717313, de Campo Novo do Parecis/MT, bem como dos casos humanos H731172, de Tangará da Serra/MT e H745332, de Novo Progresso/PA.

Segundo a análise do programa *BLAST search*, as amostras de Rondônia AN693269 e AN693292 apresentaram identidade maior com o VRIOM. As amostras AN717313, do Mato Grosso e H745332, do Pará, apresentaram identidade maior com o VCAS, e a amostra de Mato Grosso H731172 com o VLN (Tabela 2).

Com a análise pelo programa Geneious 4.8.3 foi possível o reconhecimento de uma ORF principal, no sentido 3'→5', nas referidas amostras (Tabela 2), medindo 1.287nt, e responsável pela codificação da proteína N com 428aa. Ademais foi observada uma ORF secundária em todas as sequências, que está situada na posição 80 a 271nt, no mesmo sentido da ORF principal, medindo 192nt, correspondente à descrição de uma possível proteína não-estrutural (NSs) de 63aa. A amostra H731172 possui uma ORF na posição 41 a 271, também codificando uma possível proteína NSs de 76 aa.

As ORFs secundárias foram confrontadas com banco de dados de proteínas (PFAM – <http://pfam.sanger.ac.uk/> -, InterPro – www.ebi.ac.uk/interpro/ - e BLASTp - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e verificadas quanto à funcionalidade, sendo também utilizado o programa Phyre 2 (KELLEY E STERNBERG, 2009 - <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>). Não foi possível identificar atividade enzimática para essas possíveis proteínas não-estruturais (NSs).

Tabela 2 - Amostras sequenciadas pelo método de pirosequenciamento, mostrando os dados de comprimento da ORF principal e proteína codificada além dos dados de identidade nucleotídica fornecidos pelo *BLAST*.

Dados da Amostra				ORF			Dados do BLAST		
Registro	UF	Hospedeiro	Amostra Biológica	Tamanho da ORF (nt)	Tamanho da Proteína N (aa)	Hantavirus com maior identidade	Número de acesso	e-value	Percentual de identidade
AN693269	RO	<i>O. microtis</i>	Fígado	1.287nt	428 aa	VRIOM	U52136.1	2e-107	84%
AN693292	RO	<i>O. microtis</i>	Fígado	1.287nt	428 aa	VRIOM	U52136.1	4e-109	84%
AN717313	MT	<i>O. utiaritensis</i>	Pulmão	1.287nt	428 aa	VCAS	AF307324.1	9e-121	85%
H731172	MT	Humano	Sangue	1.287nt	428 aa	HMT 08-02 (VLN)	FJ816031.1	0.0	99%
H745332	PA	Humano	Sangue	1.287nt	428 aa	VCAS	AF307324.1	0.0	99%

* nt = nucleotídeos; aa = aminoácidos

6.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os métodos de análise filogenética (NJ, MP, MV e Bayesiano) utilizados na construção das árvores mostraram topologias semelhantes, porém o método de escolha para representar a filogenia dos hantavírus deste estudo foi o da MV, uma vez que apresentou valores de *bootstrap* de maior confiabilidade. Ademais, os valores a *posteriori* (análise Bayesiana) foram informados dentro de parênteses nos nós correspondentes. Os modelos de substituição nucleotídica, determinados pelo AIC, e utilizados para a construção das árvores de NJ, MP, MV e Bayesiano encontram-se listados na tabela 3.

Nas árvores filogenéticas das sequências parciais e completas do gene N, S-RNA os cinco grupos de hantavírus formados diferem quanto à ancestralidade.

Tabela 3 - Modelo de substituição nucleotídica determinado pelo critério de informação de Akaike (AIC), mostrando os dados para frequência das bases, taxa de matriz, parâmetros de distribuição gamma e proporção de sítios invariáveis.

MODELO DE SUBSTITUIÇÃO NUCLEOTÍDICA		
PARÂMETROS	GENE N PARCIAL	GENE N COMPLETO
MODELO	(GTR + I + G)	(GTR + I + G)
AIC	19358.4082	57775.8203
FREQUÊNCIA DE BASES		
A	0,3485	0.3482
C	0,2176	0.1996
G	0,1833	0.2054
T	0,2506	0.2468
TAXA DE MATRIZ		
A-C	3,2520	2.1675
A-G	7,3368	4.7499
A-T	2,8010	1.4166
C-G	1,0672	0.8426
C-T	10,8216	6.9128
G-T	1,0000	1.0000
Gamma	0,6002	0.5752
Pinvar	0,3061	0.2304

6.3.1 Sequências Parciais

A árvore filogenética das sequências nucleotídicas parciais do gene N, S-RNA (Figura 13) dos hantavírus mostra claramente a divisão entre hantavírus do Novo Mundo e hantavírus do Velho Mundo, constituindo dois grupos distintos, sendo o maior grupo representado pelos vírus do Novo Mundo, os quais possuem um ancestral comum diferente do ancestral que deu origem ao grupo dos hantavírus do Velho Mundo. Os grupos foram divididos em três clados: Sigmodontíneos (verde); Arvicolíneos (amarelo); Muríneos e Soricíneos (vermelho). O maior clado, composto pelos hantavírus Sigmodontíneos, foi subdividido em quatro subclados:

Subclado I, que abrange os hantavírus brasileiros VCAS, VARA, VJUQ e uma cepa do vírus paraguaio *Itapuã*, os vírus argentinos relacionados ao VAND (VLEC, VBMJ, VORN, *virus Pergamino* - VPRN), os vírus venezuelanos *Caño Delgadito* (VCANO) e *Maporal* (VMAP), o vírus panamenho *Choclo* (VCHO), o vírus

mexicano *Rio Segundo* (VRIOS) e alguns vírus norte americanos (VNY, VSN, *virus El Moro Canyon* - VELMC). Nesse subclado encontram-se as sequências das amostras humanas do Pará (H708928, H745332, H712177, H695323, H714214, H700306) e do Mato Grosso (H716591), além da amostra do roedor AN717313, também do Mato Grosso. Todas elas foram relacionadas ao hantavírus amazônico VCAS;

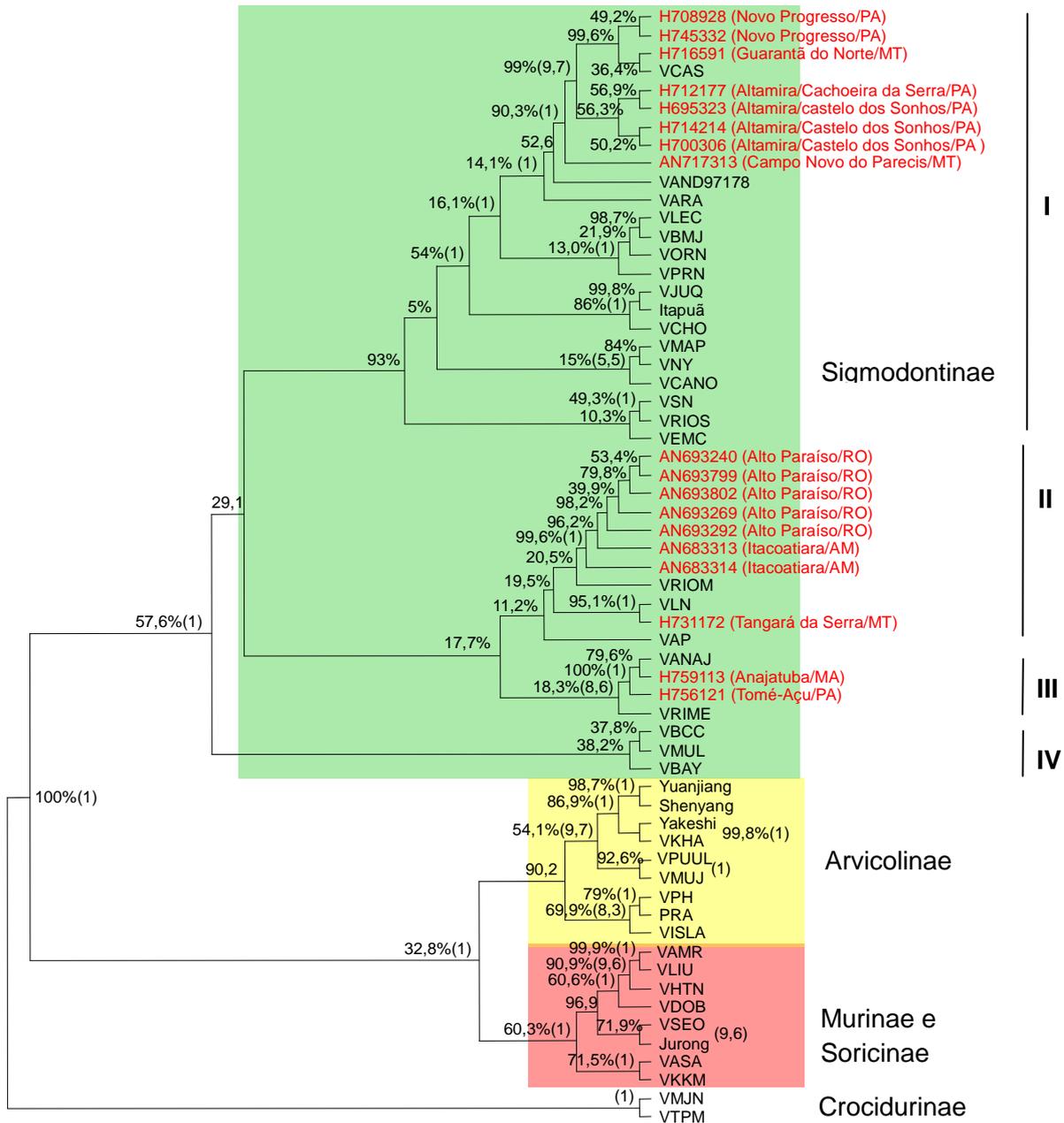
Subclado II, onde estão agrupadas as sequências das amostras dos roedores AN693240, AN693799, AN693802, AN693269 e AN693292, provenientes de Rondônia, e AN683314 e AN683313, do Amazonas, juntamente ao VRIOM, encontrado no Peru e Bolívia. Nesse subclado também se agrupa com o VLN, a amostra de humano proveniente do Mato Grosso, H731172;

Subclado III, abrangendo o hantavírus brasileiro VRIME e as amostras H759113, do Maranhão e H756121, do Pará, agrupadas juntamente ao VANAJ.

Subclado IV, representado pelos hantavírus norte-americanos VBCC, *virus Muleshoe* (VMUL) e VBAY.

O clado dos hantavírus Arvicolíneos abrange os vírus chineses *Shenyang*, *Yuanjiang* e *Yakeshi*, bem como os vírus russos *khabarovisk* (VKHA) e VPUU, os vírus americanos *Prairie Vole* (VPRA), *virus Prospect Hill* (VPH), *virus Isla Vista* (VISLA) e o *virus Muju* (VMUJ), circulante na Coreia (Figura 13). Um único clado abrangendo os hantavírus Muríneos e Soricíneos foi composto pelos vírus chineses VLIU, *Amur* (VAMR), VHTN e VSEO, a cepa *Jurong* do vírus *Serang*, de Cingapura, o *virus Dobraava* (VDOB), da Eslovênia e os vírus circulantes no Japão e Rússia: *Asama* (VASA) e *kenkeme* (VKKM), respectivamente. Os Muríneos e Soricíneos não obtiveram valores de *bootstrap* suficientemente significantes para formar clados separados (Figura 13).

Figura 13 - Árvore filogenética construída pelo método da máxima verossimilhança pelo programa PHYML, a partir de sequências parciais das amostras em estudo e demais hantavírus disponíveis no GenBank. Valores de *bootstrap* estão representados em cada nó, bem como os valores *a posteriori* (parênteses).



Legenda: VCAS (*virus castelo dos Sonhos*); VAND97178 (*virus Andes*, cepa 97178); VARA (*virus Araraquara*); VLEC (*virus Lechiguanas*); VBMJ (*virus Bermejo*); VORN (*virus Oran*); VPRN (*virus Pergamino*); VJUQ (*virus Juquitiba*); VCHO (*virus Choclo*); VMAP (*virus Maporal*); VNY (*virus New York*); VCANO (*virus Cano Delgadito*); VSN (*virus Sin Nombre*); VRIOS (*virus Rio Segundo*); VEMC (*virus El Moro Canyon*); VRIOM (*virus Rio Mamoré*); VLN (*virus laguna Negra*); VANAJ (*virus Anajatuba*); VRIME (*virus Rio Mearim*); VBCC (*virus Black Creeck canal*); VMUL (*virus Muleshoe*); VBAY (*virus Bayou*); VKHA (*virus khabarovisk*); VPUUL (*virus Puumala*); VMUJ (*virus Muju*); VPH (*virus Propect Hill*); VISLA (*virus Isla Vista*); VAMR (*virus Amur*); VLIU (*virus Liu*); VHTN (*virus Hantaan*); VDOB (*virus Dobraava-Belgrade*); VSEO (*virus Seoul*); VASA (*virus Asama*); VKKM (*virus kenkeme*); VMJN (*virus Imijin*); VTPM (*virus Thottapalayam*).

Os percentuais de homologia nucleotídica e aminoacídica obtidos pelo programa ClustalW, entre o VRIOM e as amostras estudadas AN683313, AN683314, procedentes de Itacoatiara/AM e AN693269, AN693292, AN693799, AN693240 e AN693802, de Alto Paraíso/RO foram em média de 76,8% e 91%, respectivamente (área amarela da tabela 4).

As amostras de humanos H756121, de Tomé-Açu/PA e H759113, de Anajatuba/MA apresentaram maior homologia nucleotídica e aminoacídica ao VANAJ, cuja média dos percentuais foi de 94,3% e 94,6%, respectivamente (área verde da tabela 4). A amostra H731172 procedente de Tangará da Serra/MT mostrou homologia nucleotídica (87,5%) e aminoacídica (100%) maior com o VLN (área lilás da tabela 4).

As amostras de Campo Novo do Parecis/MT (AN717313), Garantã do Norte/MT (H716591), Altamira/Cachoeira da Serra/PA (H712177), Altamira/Castelo dos Sonhos/PA (H714214, H695323 e H700306) e Novo Progresso (H745332) mostraram homologia nucleotídica média de 89,2% e aminoacídica média de 93,5% com o VCAS (área azul da tabela 4).

Tabela 4 - Percentuais de homologia nucleotídica (diagonal superior) e aminoacídica (diagonal inferior em negrito) entre as sequências parciais estudadas e os vários hantavírus do Velho e Novo Mundos. As áreas coloridas representam os percentuais das amostras estudadas e dos vírus com as quais apresentaram maior homologia nucleotídica e aminoacídica.

	VRIOM	AN 683313	AN 683314	AN693269	AN693292	AN 693799	AN 693240	AN 693802	VANAJ	H756121	H759113	VLN	H731172	VCAS	AN717313	H712177	H695323	H700306	H714214	H708928	H716591	H745332	VAND	VRIME	VARA	VJUQ
VRIOM	***	74.3	74.6	81.3	81.1	75.3	75.5	75.8	82.3	75.3	82.5	83.2	82.5	78.4	79.9	70.7	71.0	76.0	71.0	65.7	70.7	78.2	81.8	81.5	79.4	79.4
AN 683313	87.1	***	92.6	92.3	92.6	88.0	87.8	88.0	80.6	80.3	80.9	83.0	80.9	79.5	77.9	79.8	80.1	79.5	79.5	73.9	79.5	79.8	80.6	79.3	82.2	78.5
AN 683314	87.8	97.6	***	95.1	95.3	88.0	87.8	88.0	79.7	77.9	79.7	80.7	79.7	78.6	75.8	78.1	78.4	78.1	77.9	72.7	77.9	78.4	78.4	78.1	81.0	77.6
AN693269	97.1	100.0	97.7	***	99.8	92.3	92.6	92.8	81.8	73.4	81.5	81.1	81.1	81.3	80.1	73.4	73.6	78.7	73.1	68.1	73.1	81.1	81.3	78.4	80.8	80.3
AN693292	97.1	100.0	97.7	100.0	***	92.6	92.3	92.6	81.5	73.1	81.3	81.1	81.1	81.3	79.9	73.4	73.6	78.7	73.1	68.1	73.1	81.1	81.1	81.1	78.2	80.6
AN 693799	89.2	94.4	89.8	92.1	92.1	***	99.2	99.0	80.3	73.1	80.8	80.0	80.5	80.8	79.0	73.3	73.6	78.2	73.1	67.4	73.3	80.5	80.3	77.4	79.5	79.0
AN 693240	89.2	94.4	89.8	92.1	92.1	99.2	***	99.7	80.5	73.3	81.3	80.0	80.5	80.8	79.2	73.3	73.6	78.2	73.1	67.4	73.3	80.5	80.5	77.7	79.7	79.2
AN 693802	89.9	95.2	90.6	92.8	92.8	98.5	99.2	***	80.8	73.6	81.5	80.3	80.8	81.0	79.5	73.6	73.8	78.5	73.3	67.7	73.6	80.8	80.8	77.9	80.0	79.5
VANAJ	97.8	95.2	93.8	95.7	95.7	93.8	93.8	94.6	***	87.8	98.8	80.8	82.7	78.7	79.9	71.5	71.2	75.3	70.7	66.7	71.9	78.9	80.1	81.5	79.9	81.3
H756121	87.8	94.4	91.4	85.6	85.6	85.4	85.4	86.2	89.9	***	96.8	78.9	83.2	77.9	79.7	78.2	77.9	77.4	77.4	72.6	77.9	78.2	79.7	80.0	78.7	81.3
H759113	97.1	95.2	93.8	95.0	95.0	93.8	94.6	95.4	99.3	99.2	***	80.3	82.7	78.4	79.6	71.5	71.2	75.1	70.7	66.7	71.9	78.7	80.1	80.8	80.1	81.3
VLN	97.1	96.8	94.5	97.1	97.1	95.4	95.4	96.2	97.1	96.0	96.4	***	87.5	78.2	81.5	71.9	72.2	76.5	71.7	65.9	71.2	78.4	81.3	78.9	80.6	80.3
H731172	97.1	96.8	94.5	97.1	97.1	95.4	95.4	96.2	97.1	96.0	96.4	100.0	***	79.1	79.6	72.9	72.9	77.2	72.4	66.9	72.2	79.4	80.3	77.5	79.4	79.6
VCAS	92.8	92.8	91.4	93.5	93.5	91.5	91.5	92.3	93.5	92.1	92.8	93.5	93.5	***	85.1	86.3	86.8	93.3	87.3	84.4	91.4	99.3	82.7	75.5	79.4	81.3
AN717313	94.2	91.2	89.8	92.1	92.1	90.0	90.0	90.8	95.0	93.7	94.2	93.5	93.5	98.6	***	80.6	80.8	85.4	80.3	71.7	77.9	85.4	83.7	78.2	82.7	82.3
H712177	84.9	92.8	91.4	85.6	85.6	83.8	83.8	84.6	85.6	92.1	85.6	85.6	85.6	92.1	90.6	***	99.5	98.7	99.0	85.9	93.5	93.5	83.1	75.3	79.9	80.7
H695323	84.9	92.8	91.4	85.6	85.6	83.8	83.8	84.6	85.6	92.1	85.6	85.6	85.6	92.1	90.6	100.0	***	99.2	99.5	86.5	94.0	94.0	83.3	75.0	80.2	81.0
H700306	90.6	92.8	91.4	91.4	91.4	89.2	89.2	90.0	91.4	92.1	90.6	91.4	91.4	97.8	96.4	100.0	100.0	***	93.9	81.6	88.7	94.6	83.6	74.8	79.7	81.6
H714214	84.9	92.8	91.4	85.6	85.6	83.8	83.8	84.6	85.6	92.1	85.6	85.6	85.6	92.1	90.6	100.0	100.0	94.1	***	86.5	94.5	94.0	82.8	74.5	79.7	81.0
H708928	78.4	86.4	84.4	79.1	79.1	77.7	77.7	78.5	78.4	84.9	78.4	79.1	79.1	84.9	83.5	92.2	92.2	86.8	92.2	***	98.3	98.9	81.2	75.4	77.9	81.0
H716591	84.2	92.0	90.6	84.9	84.9	83.8	83.8	84.6	84.9	91.3	84.9	84.9	84.9	91.4	89.9	99.2	99.2	93.4	99.2	98.3	***	99.0	81.5	75.3	78.9	80.2
H745332	92.1	92.0	90.6	92.8	92.8	90.8	90.8	91.5	92.8	91.3	92.1	92.8	92.8	99.3	97.8	99.2	99.2	99.3	99.2	98.3	98.4	***	83.0	75.8	79.6	81.5
VAND	95.0	93.6	92.2	94.2	94.2	92.3	92.3	93.1	95.7	94.4	95.0	95.7	95.7	97.8	97.8	97.7	97.7	97.8	97.7	96.6	96.9	97.1	***	80.8	82.7	80.6
VRIME	97.1	96.0	94.5	96.4	96.4	94.6	94.6	95.4	96.4	95.2	95.7	95.0	95.0	92.1	93.5	91.4	91.4	91.9	91.4	89.9	90.6	91.4	93.5	***	75.5	77.0
VARA	92.8	92.0	90.6	92.1	92.1	90.8	90.8	91.5	93.5	92.9	93.5	94.2	94.2	95.7	95.7	96.1	96.1	95.6	96.1	95.0	95.3	95.0	97.8	91.4	***	81.8
VJUQ	93.5	92.0	90.6	92.8	92.8	90.8	90.8	91.5	95.0	93.7	94.2	95.0	95.0	96.4	96.4	96.1	96.1	96.3	96.1	95.0	95.3	95.7	98.6	92.1	97.8	***

Legenda: vírus Rio Mamoré (VRIOM), vírus Anajatuba (VANAJ), vírus Laguna Negra (VLN), vírus Castelo dos Sonhos (VCAS), vírus Andes (VAND), vírus Rio Mearim (VRIME), vírus Araraquara (VARA) e vírus Jujutiba (VJUQ).

6.3.2 Sequências completas do Gene N

A árvore filogenética representativa das sequências completas do gene N, segmento S dos hantavírus em estudo foi dividida em quatro grupos principais segundo a distribuição dos hantavírus: vírus Sigmodontíneos (em verde); vírus Arvicolíneos (em azul); Muríneos (em amarelo) e Soricíneos (em vermelho). O grupo correspondente aos hantavírus Sigmodontíneos possui um ancestral comum com o grupo dos hantavírus Arvicolíneos, ao passo que, os hantavírus Muríneos e Soricíneos originaram-se de ancestrais diferentes (Figura 14). O grupo dos hantavírus Sigmodontíneos foi subdividido em cinco clados baseados na epidemiologia dos hantavírus:

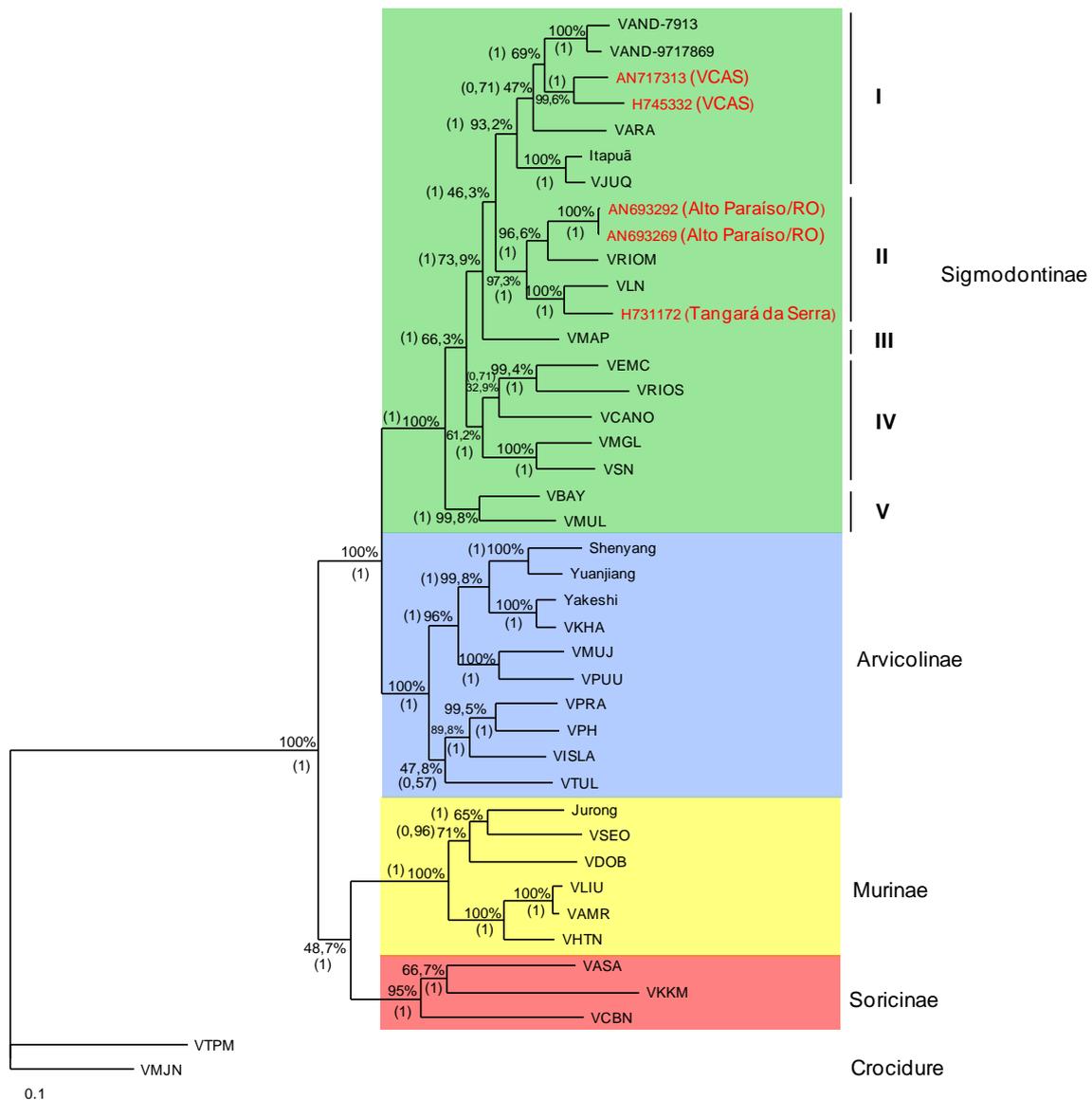
Clado I inclui cepas do VAND (VAND-7913 e VAND-9717869), bem como os hantavírus brasileiros VARA e VJUQ e uma cepa do vírus Itapuã. As amostras AN717313 e H745332 (*bootstrap*=99,6%, valor a *posteriori*=1) foram incluídas nesse clado, relacionando-se aos demais membros; **Clado II** inclui o VRIOM e o VLN. As amostras provenientes dos roedores AN693292 e AN693269 (*bootstrap*= 96,6%, valor a *posteriori*=1), procedentes de Rondônia, estão relacionadas ao VRIOM e a amostra de humano H731172, proveniente do Mato Grosso, foi relacionada ao VLN (*bootstrap*= 100%, valor a *posteriori*=1); **Clado III** é composto apenas pelo VMAP, da Venezuela; **Clado IV** abrange o VELMC, *virus Monogahela* (VMGL), VSN, VRIOS e VCANO; **Clado V** representado pelo VBAY e VMUL.

Os clados foram ainda subdivididos em 11 subclados, segundo os critérios filogenéticos (valores de *bootstrap* e *posteriori*):

Subclado I que inclui cepas do VAND (VAND-7913 e VAND-9717869); **subclado II** inclui as amostras AN711313 e H745332 com *bootstrap* = 99,6% e valor a *posteriori* =1; **subclado III** é representado apenas pelo VARA; **subclado IV** inclui o VJUQ e uma cepa do vírus Itapuã; **subclado V** agrupa o VRIOM juntamente às amostras provenientes dos roedores AN693292 e AN693269, procedentes de Rondônia; o **subclado VI** agrupa o VLN e a amostra proveniente de humano do Mato Grosso, H731172 apresentando valor de *bootstrap* = 99,6% e valor a *posteriori* =1; **subclado VII** abrangendo apenas o VMAP, da Venezuela; **subclado VIII**, do qual pertencem os vírus VELMC e VRIOS; **subclado IX** é representado pelo VCANO; **subclado X** representado pelo VMGL e VSN e **subclado XI** que inclui o VBAY e o VMUL.

O clado dos hantavírus Arvicolíneos abrange os mesmos vírus da árvore parcial acrescido do VTUL, circulante na Alemanha. O clado dos hantavírus Muríneos abrange o VLIU, VAMR, VHTN e VSEO, a cepa *Jurong* do vírus *Serang* e o VDOB, e a clade dos hantavírus Soricíneos abrange os vírus do Japão, Rússia e Vietnã: VASA; VKKM e CBNV, respectivamente.

Figura 14 - Análise filogenética das sequências completas do segmento S, gene N dos hantavírus procedentes dos estados do Mato Grosso, Rondônia e Pará obtidas no presente estudo (em vermelho). As árvores foram construídas com os métodos de MV e bayesiano usando os programas PHYML e MrBayes, respectivamente. Valores de bootstrap e bayesianos (entre parênteses) são mostrados em cada nó. As sequências dos hantavírus *Imijin* (VMJN) e *Thottapalayam* (VTPM) foram usadas como grupo externo.



Legenda: VAND-7913 e VAND-9717869 (cepas do *virus Andes*); VARA (*virus Araraquara*); VJUQ (*virus Juquitiba*); VRIOM (*virus Rio Mamoré*); VLN (*virus laguna Negra*); VMAP (*virus Maporá*); VEMC (*virus El Moro Canyon*); VRIOS (*virus Rio Segundo*); VCANO (*virus Cano Delgadito*); VMGL (*virus Monongahela*); VSN (*virus Sin Nombre*); VBAY (*virus bayou*); VMUL (*virus Muleshoe*); VKHA (*virus khabarovisk*); VMUJ (*virus Muju*); VPUUL (*virus Puumala*); VPH (*virus Propect Hill*); VISLA (*virus Isla Vista*); VTUL (*virus Tula*); VSEO (*virus Seoul*); VDOB (*virus Dobraava-Belgrade*); VLIU (*virus Liu*); VAMR (*virus Amur*); VHTN (*virus Hantaan*); VASA (*virus Asama*); VCBN (*virus Cao Bang*).

O percentual de homologia nucleotídica fornecido pelo Clustal W entre os vírus relacionados ao VRIOM e as amostras AN693269 e AN693292 foi em média de 84,6%, enquanto que, o percentual aminoacídico foi em média 97,4%. Para a amostra H731172, relacionada ao VLN, os percentuais médios nucleotídicos e aminoacídicos foram de 85,8% e 96,7%, respectivamente.

As amostras AN717313 e H745332 apresentaram maior homologia nucleotídica (média de 82,9%) e aminoacídica (95%) ao VAND (Tabela 5).

Tabela 5 - Percentuais de homologia nucleotídica (diagonal superior) e aminoacídica (diagonal inferior em negrito) entre as sequências completas do gene N, segmento S das amostras estudadas e outros hantavírus, destacando-se em cores os percentuais de homologia entre as amostras e os vírus com as quais apresentaram maior homologia.

	VRIOM	AN693269	AN693292	VLN	H731172	AN717313	H745332	VAND	VARA	VJUQ	VMAP	VSN
VRIOM	***	84,8	84,5	81,4	80,8	80	71,0	79,4	78,2	78,8	81,0	75,7
AN693269	97,4	***	99,6	80,8	81,1	80	72,8	78,8	78,4	79,8	79,8	75,4
AN693292	97,4	100	***	80,9	81,0	80	72,9	78,7	78,2	79,7	79,7	75,2
VLN	92,8	92,3	92,3	***	85,8	80,8	72,3	78,6	78,7	79,2	78,1	76,4
H731172	92,3	91,8	91,8	96,7	***	78,9	72,5	78,2	77,9	79,2	78,2	75,5
AN717313	90,2	90,4	90,4	90,2	90	***	86,3	83,8	82	83,5	79,2	76,6
H745332	81,1	82,1	82,1	81,8	82,3	97,7	***	82,1	80,8	82,6	78,1	76,5
VAND	91,1	90,4	90,4	90	90	95,3	94,7	***	81,7	82,6	79,7	75,7
VARA	90	89,7	89,7	89	89,3	93,2	92,7	93,5	***	81	78,9	76,5
VJUQ	90,4	89,7	89,7	90,2	90,2	94,4	93,9	94,9	92,8	***	80,3	76,4
VMAP	91,6	91,4	91,4	89,5	89,5	90,4	90,1	91,6	90,2	91,1	***	75,4
VSN	84,6	85,1	85,1	85,3	86,7	86,5	87,1	85,5	85,8	86	86	***

Legenda: *virus Rio Mamoré* (VRIOM), *virus Laguna Negra* (VLN), *virus Andes* (VAND), *virus Araraquara* (VARA), *virus Juquitiba* (VJUQ), *virus Maporal* (VMAP) e *virus Sin Nombre* (VSN).

6.4 RESULTADOS DA ANÁLISE DE SIMILARIDADE - SIMPLOT

O grau de relação filogenética das sequências nucleotídicas parciais e completas entre as amostras estudadas foi demonstrado pelo método de plotagem de similaridade utilizando os parâmetros *Window* de 200bp e *Steps* de 20bp, *GapStrip*: Kimura (2-Parâmetros), T/t: 2,0., bem como, o valor de permutação de 50% como valor limiar com relação ao eixo Y, que corresponde ao percentual de permutação filogenética (ppt) baseado nos valores de *Bootstrap*, e o eixo X representa a posição no genoma dos hantavírus.

As análises tiveram as sequências completas das amostras AN717313, H731172, AN693269 e a sequência parcial da amostra AN693269 como parâmetros de referência em relação à VSN, VLN, VJUQ, VARA, VAND, VMAP, VRIOM, *virus Alto Paraguay* (VAP), VANAJ, VRIME e às próprias amostras sequenciadas neste estudo (AN693802, AN683314, AN683313, AN693799, AN693240 e AN693292).

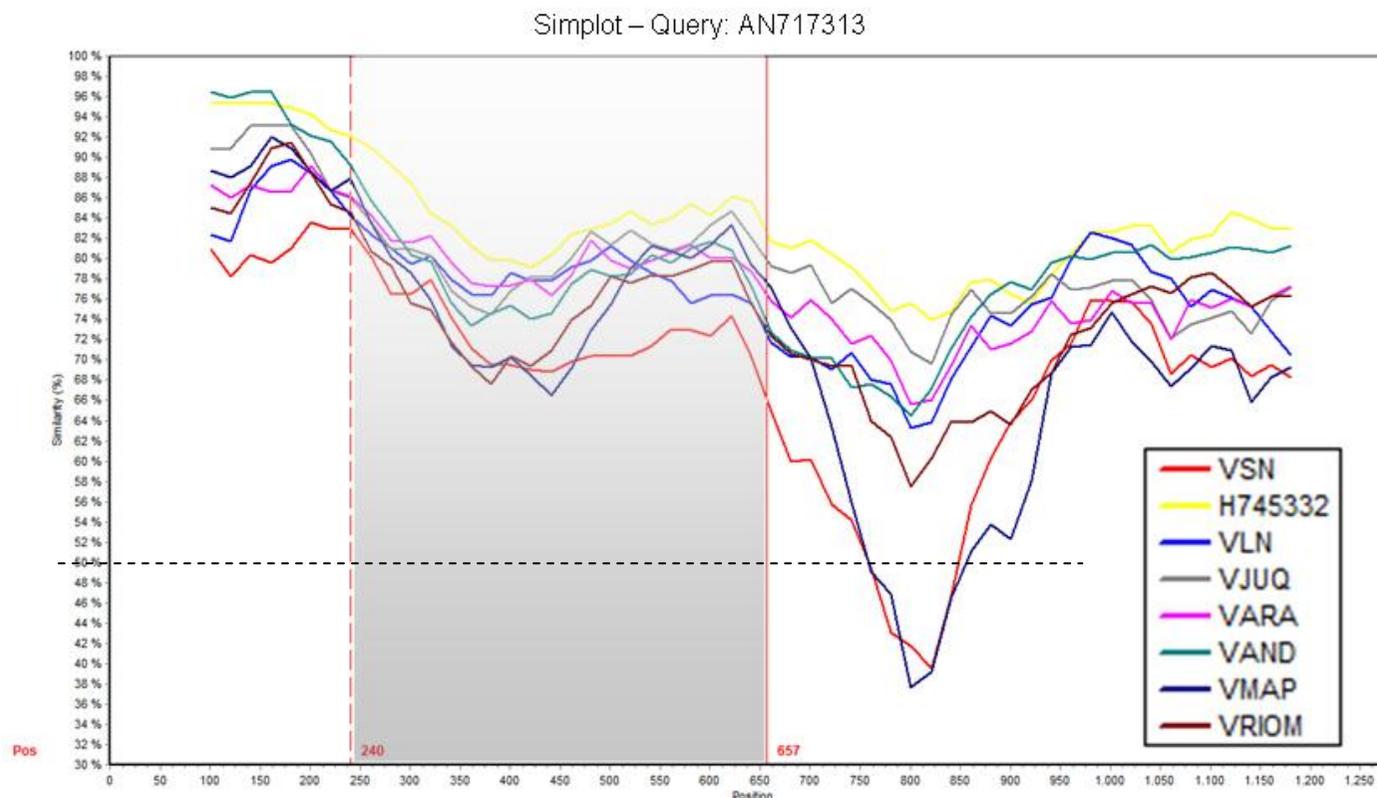
Para a ORF da amostra AN717313 observou-se uma maior similaridade com a amostra H745332 (linha amarela) ao longo de todo o genoma, enquanto que, as outras amostras sobrepõem-se, exibindo maior similaridade na região de 241nt a 657nt. (Figura 15).

Para a ORF da amostra de humano H731172 verificou-se uma maior similaridade em todo o decorrer do gene N com o VLN (linha azul escura) em relação ao VSN, VARA, VAND, VJUQ, VMAP e VRIOM (Figura 16).

Para a ORF da amostra de roedor AN693269, observou-se maior similaridade com a amostra AN693292 e similaridade menor com os demais vírus VSN, VARA, VJUQ, VAND, VMAP, VLN, com os quais foi comparada. Porém, ambas apresentaram similaridade maior ao VRIOM após a região de aproximadamente de 700nt (Figura 17).

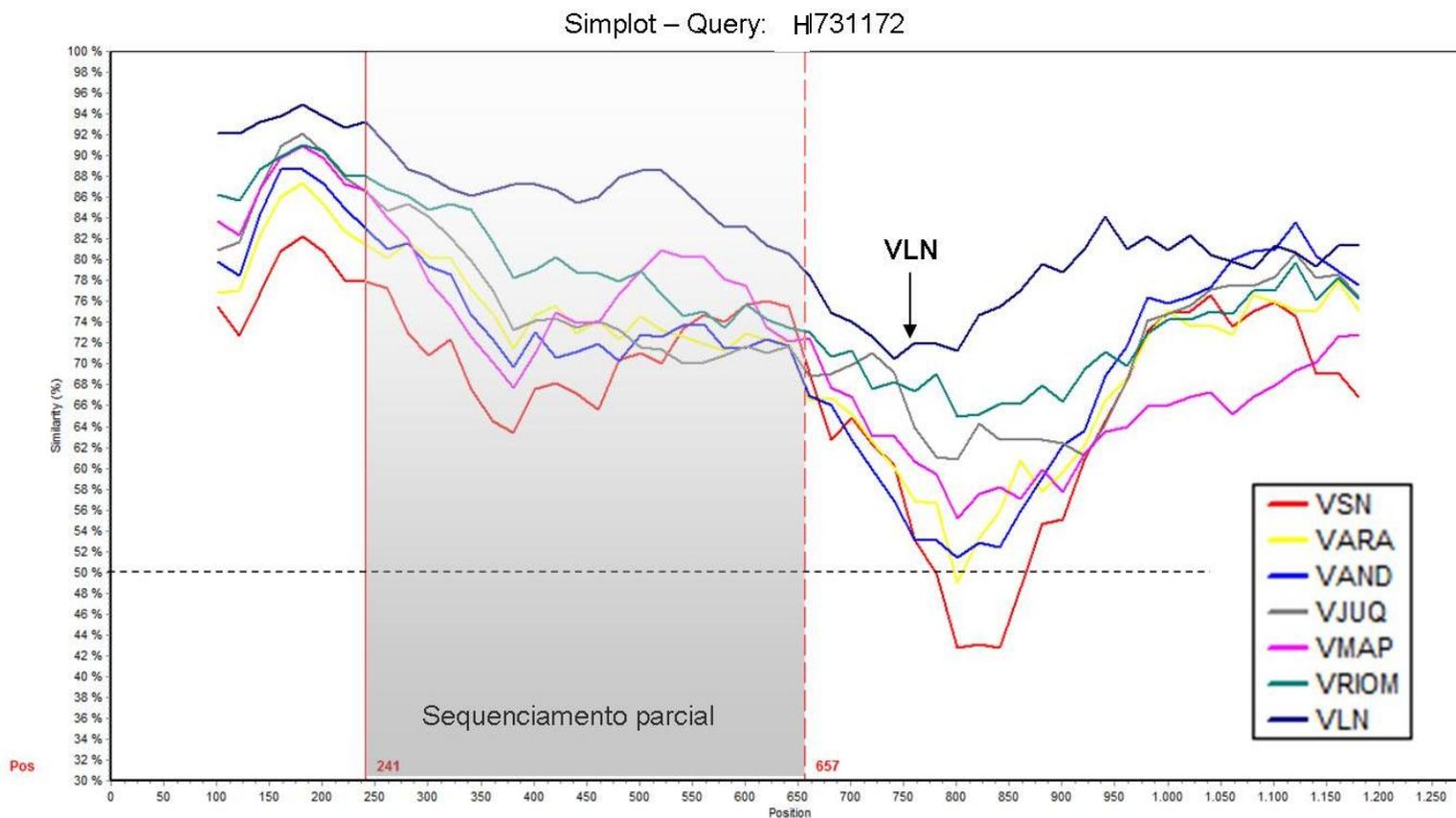
Na análise de similaridade entre as ORF's das sequências parciais verificou-se que, as sequências parciais das amostras AN693269 e AN693292, procedentes de Rondônia são praticamente iguais entre si e mais similares às amostras AN683314 e AN683313, procedentes do Amazonas. Ademais, observou-se que, todas apresentaram maior similaridade com o VRIOM do que com os demais vírus (Figura 18).

Figura 15 - Análise de similaridade utilizando o programa SimPlot versão 3.5.1 tendo como padrão de referência AN717313. A amostra H745332, bem como o VSN, VLN, VJUQ, VARA, VAND, VMAP, VRIOM foram utilizados como padrões de comparação. As linhas coloridas representam as sequências de nucleotídeos dos vírus utilizados na análise. Em destaque, região conservada de 241nt a 567nt (área cinza), que corresponde ao sequenciamento parcial, onde a similaridade entre os vírus é alta. O eixo X representa a posição no genoma em nucleotídeos (nt) e o eixo Y corresponde ao percentual de similaridade. Nota-se a maior similaridade da amostra de referência com a amostra H745332.



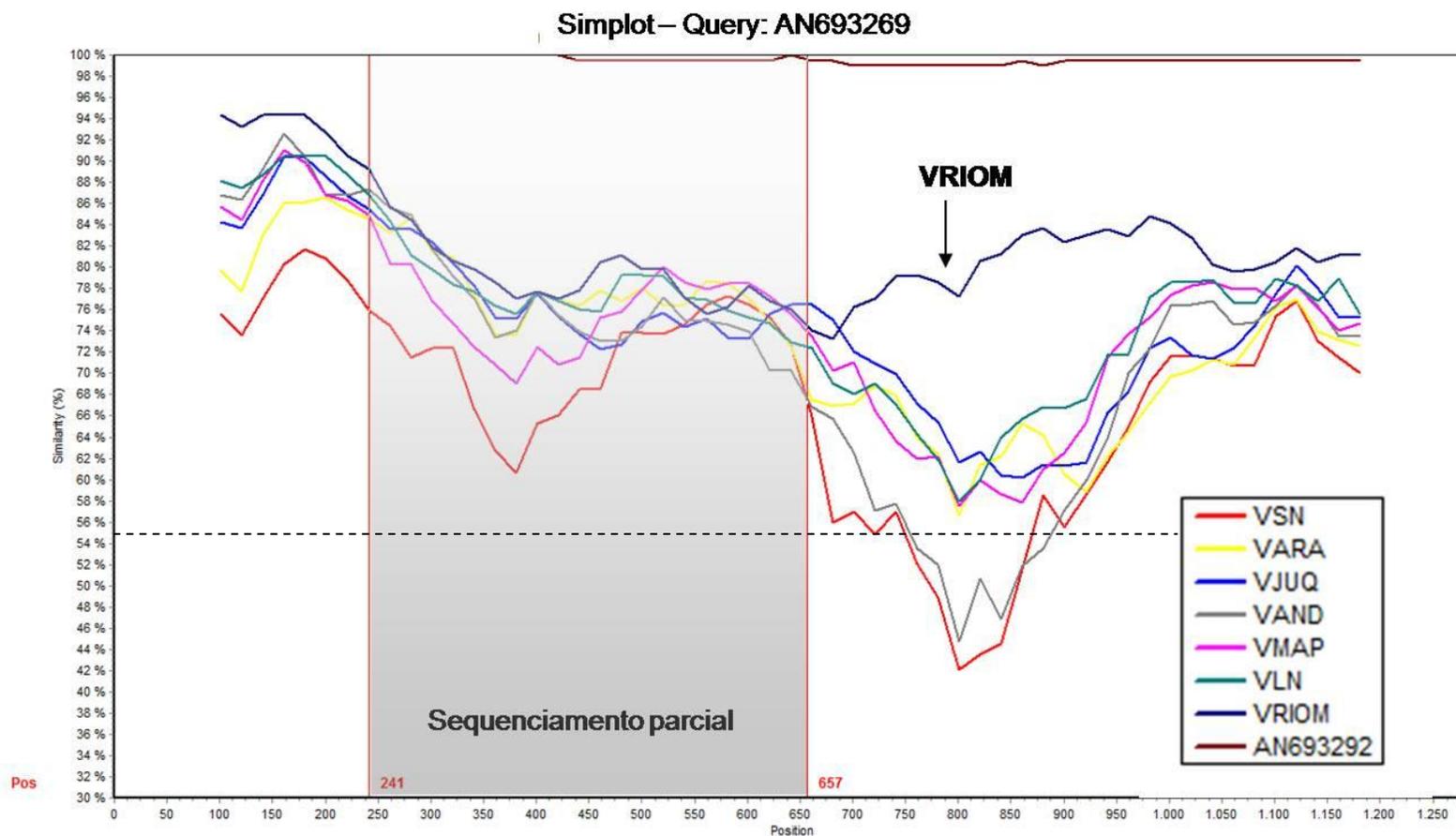
Legenda: VSN (*virus Sin Nombre*); VLN (*virus Laguna Negra*); VJUQ (*virus Juquitiba*); VARA (*virus Araraquara*); VAND (*virus Andes*); VMAP (*virus Maporal*); VRIOM (*virus Rio Mamoré*).

Figura 16 - Análise de similaridade utilizando o programa SimPlot versão 3.5.1 utilizando como referência a amostra H731172, procedente de Tangará da Serra, Mato Grosso, comparada ao VSN, VARA, VAND, VJUQ, VMAP, VRIOM e ao VLN, com o qual apresentou maior similaridade.



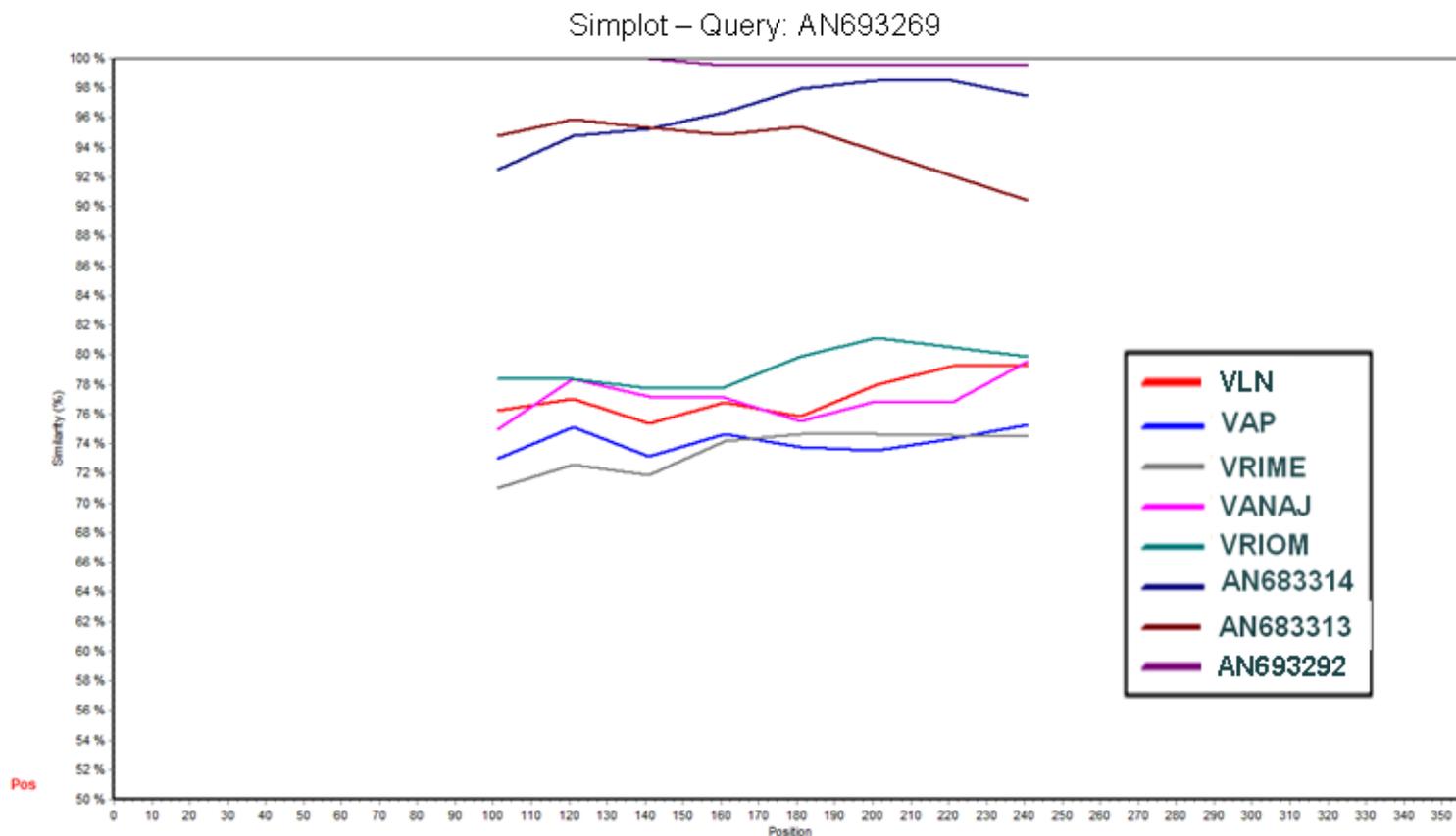
Legenda: VSN (*virus Sin Nombre*); VARA (*virus Araraquara*); VAND (*virus Andes*); VJUQ (*virus Juquitiba*); VMAP (*virus Mapora*); VRIOM (*virus Rio Mamoré*); VLN (*virus Laguna Negra*).

Figura 17 - Análise de similaridade utilizando o programa SimPlot versão 3.5.1 utilizando como referência a amostra de roedor AN693269, procedente de Alto Paraíso, Rondônia, comparada com o VSN, VARA, VAND, VMAP, VLN, VRIOM e a amostra de mesma procedência AN693292, com a qual mostrou maior similaridade.



Legenda: VSN (*virus Sin Nombre*); VARA (*virus Araraquara*); VAND (*virus Andes*); VJUQ (*virus Juquitiba*); VMAP (*virus Maporal*); VRIOM (*virus Rio Mamoré*); VLN (*virus Laguna Negra*).

Figura 18. Análise de similaridade baseada nas sequências parciais dos hantavírus do Amazonas e Rondônia. A amostra AN693269 foi utilizada como referência comparada ao VSN, VAP, VRIME, VANAJ, VRIOM e às amostras AN693802, AN683313, AN683314 e AN693292. O gráfico evidencia a maior similaridade entre as amostras de Rondônia e Amazonas com o VRIOM.



Legenda: VLN (*virus Laguna Negra*); VAP (*virus Alto Paraguay*); VRIME (*virus Rio Mearim*); VANJ (*virus Anajatuba*); VRIOM (*virus Rio Mamoré*).

7 DISCUSSÃO

Desde que foi descrita nos EUA em 1993 (NICHOL et al., 1993; CHILDS et al., 1994), a SPH tem sido detectada nas regiões Norte (DOS SANTOS et al., 2006; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2005; 2008; 2010), Centro-Oeste (JOHNSON et al., 1999; MENDES et al., 2001;2010), Sul e Sudeste do Brasil, (IVERSSON et al.,1994; VASCONCELOS et al.,1997; JOHNSON et al., 1999), no entanto, os dados sobre a circulação dos diversos hantavírus, sua distribuição geográfica, a relação com seu roedor reservatório, a soroprevalência da infecção nas populações humanas e de roedores e o real impacto na saúde pública, ainda são incompletos. Isto se deve ao fato das hantavirose relacionadas à SPH ainda serem doenças emergentes e, portanto, pouco conhecidas pela população em geral (HJELLE E TORRES-PÉREZ et al., 2010).

Neste contexto, a eficiência do sistema de vigilância epidemiológica, aliado a estudos ecoepidemiológicos e laboratoriais, contribui para a identificação de novos hantavírus e de seus reservatórios, além do conseqüente aumento das notificações de casos, promovendo ações para um melhor controle e prevenção da doença.

A caracterização molecular constitui, atualmente, uma ferramenta importante e imprescindível para a identificação viral dos diversos tipos de hantavírus existentes, associados ou não à doença humana. Com o intuito de realizar a caracterização molecular dos hantavírus circulantes em diversos estados da região Amazônica foi realizado este estudo, onde foram obtidas seqüências completas e parciais de hantavírus direcionadas ao gene N em amostras de vísceras de roedores silvestres, capturados durante estudos ecoepidemiológicos nos anos de 2004, 2005, 2006, e soro/sangue de casos humanos positivos para SPH dos anos de 2005, 2006, 2007 2008 e 2009, além de *pool* de vísceras de um óbito ocorrido em 2009 (quadros 1 e 2).

Os amplicos de aproximadamente 434 pares de bases gerados nos produtos parciais estão de acordo com JOHNSON et al., 1997, que descreveram um conjunto de iniciadores degenerados a partir do alinhamento de regiões conservadas

do segmento S de várias sequências de hantavírus associados com roedores Sigmodontíneos, cujo tamanho do produto corresponde ao obtido neste estudo.

Foram obtidas sequências completas e parciais direcionadas ao gene N, S-RNA dos hantavírus em amostras de casos humanos e de roedores silvestres através da combinação de diferentes tecnologias de sequenciamento nucleotídico aplicadas em paralelo: o clássico e amplamente utilizado método de sequenciamento nucleotídico baseado em SANGER et al. 1977, que emprega dideoxynucleotídeos marcados com diferentes fluorocromos; e a tecnologia de nova geração, o pirosequenciamento, capaz de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida (MEYER et al., 2007; ROTHBERG E LEAMON, 2008).

A análise prévia das sequências completas revelou ORFs principais com 1287nt de tamanho, assim como ocorre nos demais hantavírus Sigmodontíneos. Foi observada, também, a existência de ORFs secundárias, que seriam responsáveis por codificar uma possível proteína não-estrutural (NSs), já descrita para outros hantavírus como o VPUUL e o VTUL (PLYUSNIN, 2002; JAASKELAINEN et al., 2007; 2008), bem como para alguns integrantes da família *Bunyaviridae*, gêneros *Orthobunyavirus* e *Phlebovirus* (ELLIOT, 1991; SCHMALJOHN, 1996). Ao confrontar com banco de dados de proteínas e programas disponíveis verificou-se ausência de função determinada. Para confirmar a existência de NSs nos hantavírus identificados nesse trabalho, bem como determinar a sua função, tornam-se necessários estudos experimentais adicionais, visto que, alguns autores sugerem que as ORFs para NSs do VTUL e VPUUL são funcionais (JAASKELAINEN et al., 2007; 2008; VIRTANEN et al., 2010).

Segundo estudos moleculares prévios, a análise filogenética dos hantavírus usualmente é baseada nos métodos de MP e/ou NJ (BOHLMAN et al., 2002; CHIZHIKOV et al., 1995; JOHNSON et al., 1999; LEVIS, 1998; PADULA et al., 2000; RABONI et al., 2005; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2005). No entanto, para maior confiabilidade na análise dos resultados, foram utilizados neste trabalho, além dos métodos clássicos para o estudo filogenético de hantavírus, os métodos de MV e Bayesiano, considerados métodos mais acurados para a reconstrução filogenética e origem evolutiva (LUNTER et al., 2005).

O método da MV foi o escolhido para representar a filogenia das sequências dos hantavírus deste trabalho, de maneira semelhante a outros estudos (ARAI et al., 2008; SONG et al., 2007; ZOU et al., 2008), utilizando como grupo externo os vírus VMJN e VTPM, a exemplo de outras análises moleculares (SONG et al., 2007; ARAI et al., 2008; KANG et al., 2010).

Duas árvores filogenéticas pelo método da MV foram construídas, uma com as sequências completas do gene N, S-RNA, e outra com as sequências parciais, S-RNA. A árvore filogenética das sequências nucleotídicas parciais apresentou valores baixos de *bootstrap*, implicando em menor confiabilidade dos grupamentos filogenéticos.

A partir da análise das sequências completas do gene N pelo programa SimPlot, observou-se que, a região que corresponde às sequências parciais, compreendida entre as posições 241 e 657 da ORF (S-RNA) dos hantavírus estudados é bastante conservada, gerando dificuldades na separação e agrupamento correto dos vírus na reconstrução filogenética parcial ao utilizar um grande número de sequências. Este fato pode justificar os valores baixos de *bootstrap* obtidos. Por outro lado, essa região conservada pode ser utilizada como alvo para a produção de iniciadores grupo específicos para hantavírus, semelhante aos descritos por JOHNSON et al., 1997.

Observou-se, ainda, pela análise do SimPlot (5'→3'), uma região não-conservada, de aproximadamente 300nt, na porção 3' terminal do segmento S, a partir da posição 657, onde se evidencia uma diferenciação maior entre as sequências dos hantavírus, podendo esta região ser utilizada na construção de iniciadores espécie específicos a serem usados nas técnicas de RT-PCR convencional e/ou PCR em Tempo Real. Esses resultados foram similares aos obtidos por JOHANSSON et al. 2010, que também descreveu uma região não-conservada de 300nt na mesma posição, utilizando tanto sequências completas, quanto parciais dos hantavírus.

Na árvore filogenética referente à reconstrução feita com sequências parciais, apesar da maioria dos nós apresentarem valores baixos de *bootstrap*, o subclado I obteve um valor confiável de 93%, onde estão agrupadas as amostras H708928, H745332, H716591, H712177, H695323, H714214, H700306,

pertencentes às áreas de influência da BR-163, nos estados do Mato Grosso e Pará, bem como a amostra de roedor AN717313 de Campo Novo do Parecis/MT, juntamente com o VCAS. Além disso, os dados de homologia obtidos pelo programa *BLAST*, também relacionaram as amostras ao VCAS.

A emergência de hantavirose como um potencial problema de saúde pública na área de influência da Rodovia BR-163 é notório. Desde 1995, quando o primeiro caso de SPH foi identificado na região Amazônica – Castelo dos Sonhos, estado do Pará (JOHNSON et al., 1999) – um aumento do número de casos tem sido registrado em 12 municípios localizados próximos a esta rodovia, em três estados sob sua área de influência.

O estado do Mato Grosso ocupa o terceiro lugar em número de casos de SPH notificados no Brasil, e o primeiro lugar na região Amazônica. O estado do Pará ocupa o segundo lugar em número de casos na região Amazônica, onde todos os casos relatados foram reconhecidos apenas na área de influência da Rodovia BR-163 (municípios de Novo Progresso e Altamira) (MS/SVS, 2010). Em ambos os estados, casos de SPH foram relacionados à Rodovia BR-163 e foram claramente associados com atividades de agricultura, especialmente à produção de grãos (particularmente soja) e desflorestamento pela extração madeireira, as quais são as atividades econômicas mais produtivas observadas em torno da rodovia no Mato Grosso e Pará (SANTOS et al., 2006; SVS/MS, 2010).

O estudo filogenético confirmou a contínua circulação do VCAS no município de Altamira, desde 1995, e sua detecção nos municípios de Novo Progresso (estado do Pará) e Guarantã do Norte (estado do Mato Grosso), sugerindo que o VCAS é o hantavírus associado com os casos de SPH na área de influência da Rodovia BR-163 (MEDEIROS et al., 2010).

A circulação do VCAS no estado do Mato Grosso mostra o seu complexo ecossistema, que tem permitido a circulação de hantavírus diferentes que infectam humanos: o vírus *Laguna Negra-like* associado ao roedor *Calomys callidus* (TRAVASSOS DA ROSA, 2008), o qual tem sido detectado na região centro-oeste do estado (TRAVASSOS DA ROSA, 2008; RABONI et al., 2009), e reconhecido como o agente etiológico da SPH no norte da região; e o VCAS identificado previamente em roedores *Oligoryzomys utiaritensis* de Campo Novo do Parecis/MT

(TRAVASSOS DA ROSA et al., 2011), cuja circulação foi confirmada, pela primeira vez, no município de Garantã do Norte (MEDEIROS et al., 2010), no presente estudo .

A detecção de casos de SPH em curso ao longo dos anos na área de influência da Rodovia BR-163, bem como o aumento do desmatamento para o estabelecimento da agricultura, criação de gado e exploração de produtos de madeira levanta a possibilidade de um contato mais frequente entre os homens e os roedores reservatórios e, conseqüentemente, aumento do risco de surgimento de hantavírus e a ocorrência de mais casos de SPH e até mesmo de surtos.

O estado do Pará foi sede do primeiro caso de SPH na Amazônia brasileira, no ano de 1995 (JOHNSON et al., 1999), fazendo fronteira com o estado do Maranhão, onde se deu o primeiro estudo de SPH na Amazônia, que ocorreu em 2000 (MENDES et al., 2001), especificamente em Quebra e São Jerônimo, na área rural do município de Anajatuba. Quanto à distribuição de hantavírus no ecossistema Pará-Maranhão foram analisadas duas amostras de casos humanos: H756121, procedente de Tomé-Açu/PA e H759113, óbito procedente de Anajatuba/MA.

Na árvore filogenética representativa das sequências parciais dos hantavírus, as amostras acima referidas foram agrupadas juntamente ao VANAJ, reforçado pelos dados de homologia nucleotídica e aminoacídica de ambas com este vírus. Esses achados confirmam a associação do VANAJ com os casos humanos no Maranhão, descritos por TRAVASSOS DA ROSA, 2008 e TRAVASSOS DA ROSA et al. 2010. Quanto à circulação do VANAJ no município de Tomé-Açu, estado do Pará, é importante citar que, o local provável de infecção ainda não foi elucidado, não se sabendo a origem de infecção do paciente, que pode ter tido contato com o vírus no Maranhão, portanto, não se pode sugerir ainda, a circulação desse vírus no Pará.

Para confirmar a circulação do VANAJ em Tomé-Açu/PA, são necessários estudos ecoepidemiológicos com captura de roedores soropositivos para hantavírus e caracterização genética identificando o VANAJ, e/ou, a existência de mais casos humanos associados a este vírus. Apesar de os roedores da espécie *Oligoryzomys fomesi* terem sido considerados os reservatórios do VANAJ e os responsáveis pela transmissão deste vírus às populações do município de Anajatuba, no estudo de

TRAVASSOS DA ROSA et al., 2010, não se pode afirmar que esta espécie tenha sido a provável transmissora do VANAJ aos casos humanos utilizados no presente estudo, uma vez que, essa espécie não tem sido encontrada, até o momento, no norte do Pará.

A árvore filogenética baseada nas sequências completas do gene N, S-RNA foi a que melhor expressou a filogenia dos hantavírus utilizados no presente estudo. De acordo com ela os hantavírus foram divididos em quatro clados, correspondendo aos hantavírus associados aos roedores Sigmodontíneos, Arvicolíneos, Muríneos e hantavírus cujos hospedeiros são espécies de ratazanas (HORLING, et al., 1996; ZOU et al., 2008) e musaranhos (SONG, et al., 2007; KANG et al., 2010) da família Soricidae, subfamília Soricinae.

O vírus VASA representa a única exceção no clado dos hantavírus Soricíneos, pois, possui toupeiras (família Talpidae, subfamília Talpinae) como hospedeiros reservatórios. Segundo ARAI et al., 2008, a análise filogenética das sequências dos três segmentos genômicos do VASA indicou que este era distinto dos hantavírus cujos reservatórios são roedores e mais similar aos hantavírus identificados em musaranhos e ratazanas.

Na árvore gerada a partir das sequências completas do gene N, a presença de um ancestral comum entre o grupo dos hantavírus Sigmodontíneos e Arvicolíneos está de acordo com PLYUSNIN em 2002, que descreve a maior proximidade dos hantavírus Sigmodontíneos aos Arvicolíneos, do que cada um com os Muríneos, evidenciando a sua ancestralidade comum. Ademais, a disposição dos grupos na árvore filogenética mostra que, a história evolucionária e dinâmica de transmissão dos hantavírus é mais complexa do que originalmente imaginava-se, onde a existência de hantavírus, também em musaranhos Soricinae e em membros da subfamília Talpinae, contesta a visão convencional de que os roedores silvestres são os principais hospedeiros dos hantavírus (HORLING, et al., 1996; SONG, et al., 2007; ZOU et al., 2008; ARAI et al., 2008; KANG et al., 2010).

A divisão do grupo dos Sigmodontíneos em cinco clados segue as normas do segundo critério do CITV para distinção de espécies de hantavírus, baseando-se na ausência da diferença de 7% na sequência de aminoácidos do gene N entre as amostras obtidas no trabalho. De acordo com esse critério, todos os vírus que

compõe o clado I, por exemplo, são subespécies relacionadas ao VAND, entretanto, para comprovar essa classificação é necessária a análise de um número maior de sequências completas dos segmentos S e M dos hantavírus, e através de métodos experimentais observar as reações sorológicas (testes de neutralização), as características biológicas (função das proteínas), e levar em consideração, também, as distribuições geográficas dos vírus, patogênese e roedor hospedeiro, que, segundo MAES et al., 2009, são critérios importantes para distinção de linhagens de hantavírus, uma vez que, as relações genéticas entre os hantavírus do Novo Mundo são complexas, como resultado da rápida distribuição e especiação dos roedores Sigmodontíneos e eventos ocasionais de mudança de hospedeiro.

Foram obtidas as sequências completas do gene N, S-RNA dos hantavírus na amostra de roedor da espécie *O. utiaritensis*, de Campo Novo do Parecis (AN717313) e na amostra de humano oriunda de Novo Progresso (H745332). Apesar dessas amostras apresentarem baixa homologia nucleotídica entre si (86,3%), foi observada uma alta homologia aminoacídica (97,7%), indicando tratar-se do mesmo vírus. A baixa homologia nucleotídica pode ser explicada pela pressão seletiva, onde a existência de mutações silenciosas na sequência de nucleotídeos não é percebida a nível de proteína, dada a degeneração do código genético, além de ser a possível responsável pelas diferenças entre as espécies de hantavírus associadas a hospedeiros humanos e roedores.

Apesar de as referidas amostras terem apresentado homologia nucleotídica e aminoacídica maior com o VAND, ao analisar as sequências parciais de ambas, pelo programa *BLAST*, foi observada uma identidade nucleotídica maior com o VCAS (AF307324), não sendo possível representar esta identidade na árvore filogenética representativa do gene N e na tabela de homologias devido a ausência de sequências completas do VCAS no GenBank.

Muito embora a sequência parcial da amostra AN717313 tenha sido obtida por TRAVASSOS DA ROSA em 2008, sendo relacionada ao VCAS, vale ressaltar que, no presente trabalho foi obtida, pela primeira vez, a sequência completa deste hantavírus, complementando e reforçando os achados anteriores. Desta forma, o VCAS é provavelmente o hantavírus encontrado nas amostras AN717313 e H745332, confirmando a sua circulação nos estados do Pará (Novo Progresso) e

Mato Grosso (Campo Novo do Parecis, área de influência da BR-364) e está associado ao roedor da espécie *O. utiaritensis*, seu provável reservatório, segundo TRAVASSOS DA ROSA et al., 2011.

Foi obtida também a sequência completa do vírus *Laguna Negra-like* em amostra de humano (H731172) de Tangará da Serra/MT, confirmando a sua circulação contínua no estado do Mato Grosso (TRAVASSOS DA ROSA, 2008; RABONI et al., 2009), de modo semelhante observado para o VCAS, em Campo Novo do Parecis (TRAVASSOS DA, 2008; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2011).

Nesses municípios mato-grossenses, localizados às margens da rodovia BR-364, a transmissão da SPH ao homem está associada à ação antrópica, que modificou o ecossistema, forçando o deslocamento das populações de roedores. As queimadas e os desmatamentos são os principais fatores que desalojam as colônias de roedores e as obrigam a procurar novos ambientes, aumentando o risco de exposição do homem (PEREIRA et al., 2006). Percebe-se que, as alterações humanas no ambiente natural e agrícola podem levar ao aumento da população de roedores e, por conseguinte, acarretar transmissão de hantavírus, devido à maior proximidade destes às habitações humanas. Segue esta estratégia, os roedores do gênero *Calomys*, reservatórios do VLN, que, segundo PEREIRA et al., 2006, se adaptam a áreas agrícolas, mas têm que enfrentar periodicamente a destruição de seu ambiente por causa da colheita, sendo para isto, necessária uma reprodução rápida, gerando grande quantidade de indivíduos.

A caracterização genética de hantavírus brasileiros em diversos estados da região Amazônica mostra a complexidade desta região, fruto da diversidade de espécies reservatórias e virais associadas. Como já descrito, vários hantavírus foram detectados nessa região, existindo ainda, lugares onde esses vírus, até então, eram desconhecidos, como Rondônia e Amazonas.

O estado de Rondônia está situado na Amazônia brasileira, possui uma área de 237.576,167 Km², distribuída em 52 municípios, abrange os biomas cerrado e floresta amazônica e apresenta uma economia que se baseia, principalmente, na agropecuária (IBGE, 2010). O avanço da pecuária, do extrativismo madeireiro e da produção agrícola, especialmente das monoculturas (soja, milho) que exigem áreas maiores de plantio, é responsável pelo intenso desmatamento observado em todo o

estado, gerando um desequilíbrio no habitat da fauna local, fatores relacionados à dinâmica de transmissão das hantavirose, visto que, essas atividades proporcionam ambiente propício para a manutenção dos roedores silvestres e/ou deslocamento destes em direção às habitações rurais, estreitando o contato entre os hantavírus e o homem. (FERREIRA, 2003; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2005).

O primeiro registro de SPH no estado de Rondônia ocorreu no ano de 2004, no município de Alto Paraíso. A partir deste, foram registrados mais dois casos, um em São Francisco do Guaporé, no ano de 2007 e o outro ocorreu no município de Vilhena, em 2008, cujo paciente evoluiu a óbito (SVS/MS, 2010).

O surgimento de casos esporádicos nesse estado contribui para a escassez de estudos vírus-reservatório e a consequente infecção humana pelos hantavírus. Rondônia apresenta ainda, características da interferência humana que geram condições bastante favoráveis à instalação das infecções por hantavírus, além de fazer limite com o estado do Mato Grosso.

As amostras provenientes de Rondônia utilizadas foram obtidas após coleta de roedores silvestres, capturados em estudo ecoepidemiológico realizado no ano de 2005, após ocorrência de caso de SPH, no ano de 2004, no município de Alto Paraíso-RO.

Com o objetivo de caracterizar molecularmente as cepas de hantavírus circulantes no estado de Rondônia foi realizado o estudo genético das amostras obtidas de roedores silvestres da espécie *Oligoryzomys microtis*, positivos por sorologia para anticorpos IgG.

Os dados de identidade do *BLAST*, de filogenia e das análises do SimPlot das sequências parciais e completas indicaram que as amostras de roedores provenientes de Rondônia são cepas do VRIOM, portanto, *Rio Mamoré-like*, tendo como reservatório o roedor *Oligoryzomys microtis*, cuja dinâmica de distribuição também abrange países como o Peru (POWERS et.al, 1999) e a Bolívia (BHARADWAJ et al., 1997; RICHTER et al., 2010), locais de circulação do VRIOM, até o presente momento não associado com doença humana. A nomenclatura (-like) acima designada tem sido utilizada em vários outros estudos com hantavírus brasileiros (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2005, 2011; TRAVASSOS DA ROSA, 2008; RABONI et al., 2009) com base na elevada diferença nucleotídica entre as

cepas e no 2º critério do CITV, que considera como espécies distintas os hantavírus que exibem, pelo menos, 7% de diferença aminoacídica nas sequências completas, neste caso, do segmento S.

Fatores ambientais reforçam a hipótese de circulação de cepas do VRIOM no estado de Rondônia, tais como, a proximidade geográfica com a Bolívia, além do mesmo clima tropical úmido e o bioma amazônico, compartilhados na área de fronteira desse país com o referido estado, e ainda, os impactos ambientais vistos nas áreas próximas às rodovias, como é o caso da Rodovia BR-364, que liga Alto Paraíso, município de procedência das amostras à Porto Velho, capital de Rondônia (TRAVASSOS DA ROSA, 2008).

Assim como ocorre com o Peru e a Bolívia, onde não há registros de doença humana associada ao VRIOM, no estado de Rondônia atualmente não foi feita esta associação devido à ausência de casos recentes e à pouca quantidade de material dos casos existentes na coleção do Instituto Evandro Chagas. O fato de não terem sido registrados casos de SPH associados ao VRIOM levanta a hipótese da co-circulação de outros hantavírus no estado de Rondônia, assim como ocorre no Mato Grosso, onde circulam os vírus *Laguna Negra-like* (RABONI et al., 2009) e VCAS (TRAVASSOS DA ROSA, 2008; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2011).

A circulação do VRIOM em roedores *Oligoryzomys microtis*, no estado de Rondônia representa um dado inédito, pois ainda não havia registros da circulação deste vírus no Brasil. Estas informações são consideradas essenciais não só para o acompanhamento da tendência da doença no estado, mas também para instruir os profissionais dos serviços de saúde locais, bem como direcionar as medidas de prevenção indicadas, além de contribuir para o avanço dos estudos sobre hantavírus e seus hospedeiros.

O Amazonas é o maior estado do Brasil, com uma área atual de 1.559.161,682 Km². Está situado na Amazônia brasileira, possuindo 62 municípios e abrangendo 100% do bioma amazônico (IBGE, 2010). A Floresta Amazônica, que ocupa 92% da superfície estadual, possui a maior biodiversidade do planeta, com uma fauna estimada em 250 espécies de mamíferos, duas mil espécies de peixes e 1,1 mil espécies de pássaros. A economia se baseia na agricultura (mandioca, cana-de-açúcar), no extrativismo, pecuária de aves, bovinos e suínos, na mineração, e

nas indústrias alimentícia, gráfica e eletroeletrônica (<http://www.istoeamazonia.com.br>).

Seu acesso restrito devido às barreiras geográficas, rios e grande cobertura florestal é facilitado somente pela construção de estradas de deslocamento entre as áreas metropolitanas. Essas áreas que margeiam as rodovias, mais especificamente a rodovia AM-010, que liga a capital do estado Amazonas, Manaus, aos municípios de Rio Preto da Eva e Itacoatiara, caracterizam-se pela influência antrópica e fragmentação da paisagem, ocupada por regiões de pequenas atividades agrícolas e de exploração dos recursos naturais, decorrentes de propriedades particulares e diversos projetos de assentamento do Governo (SUFRAMA, 2011 - http://www.suframa.gov.br/suframa_principal.cfm). Essas atividades humanas têm ocasionado impactos significativos à natureza, o que contribui para a incidência de hantavirose.

Os primeiros três casos de SPH no estado do Amazonas foram confirmados em 2004 na parte ocidental da Amazônia brasileira, no município de Itacoatiara (SANTOS et al., 2006). Em 2005, foi detectado apenas um caso de hantavirose, procedente de Maués, com evolução para cura e uma incidência de 0,031/100 mil habitantes (SVS/MS, 2006).

Para a caracterização genética dos hantavírus circulantes no estado do Amazonas foi realizado o sequenciamento nucleotídico parcial utilizando o método de SANGER et al. 1977 das amostras de vírus provenientes de quatro roedores silvestres IgG positivos, capturados em Itacoatiara, no ano de 2004. Foram sequenciados os vírus em amostras de fígado de dois roedores silvestres *O. microtis*.

Os dados do BLAST e do SimPlot das amostras de roedores da espécie *O. microtis*, procedentes de Itacoatiara-AM indicam que o hantavírus circulante nesse estado é o vírus *Rio Mamoré-like*, também encontrado em roedores silvestres capturados em Alto Paraíso-RO neste estudo.

Como descrito anteriormente, o VRIOM é associado aos roedores silvestres *O. microtis* no Peru (POWERS et al., 1999) e Bolívia (BHARADWAJ et al., 1997; RICHTER et al., 2010). Os dois países fazem fronteira com o Amazonas e compartilham com ele parte do bioma amazônico e o clima tropical úmido. Além

disso, a exemplo do que ocorre em Rondônia com a Rodovia BR-364, os impactos ambientais vistos ao longo da Rodovia AM-010 favorecem o risco de contato do homem com os roedores silvestres reservatórios dos hantavírus, a exemplo do que ocorre com os arbovírus em áreas de implantação de rodovias (VASCONCELOS et al., 2001; NUNES et al., 2009).

Estes dados revelam informações inéditas acerca da transmissão das hantavíroses no estado do Amazonas, onde, até então, não era conhecida a espécie viral circulante, porém, o estudo da associação com casos humanos ainda não foi realizado devido à escassez de amostras provenientes desse estado.

Diversos fatores, tais como: os dados de similaridade do SimPlot entre as amostras de Rondônia e Amazonas; a alta homologia nucleotídica e aminoacídica entre os vírus rondonienses e amazonenses; o mesmo roedor reservatório; mesmo climatropical úmido; o bioma amazônico compartilhado pelos dois estados e, a proximidade geográfica entre ambos sugerem que o vírus circulante no Amazonas e Rondônia é o mesmo e que está relacionado geneticamente ao VRIOM, possuindo como reservatório primário o roedor da espécie *O. microtis*, cuja área de distribuição no Brasil se estende desde o estado do Acre, sul do Amazonas, Rondônia, sul do Pará até o norte do Mato Grosso (BONVINCINO, OLIVEIRA E D'ANDREA, 2008). Essa distribuição do roedor *O. microtis* sugere, também, a perspectiva de circulação desse vírus nos demais estados brasileiros acima citados.

Desta forma, percebe-se que, a ação antrópica que modifica o ecossistema próximo às rodovias é um fator crucial para a incidência de novos casos de SPH, como pode ser observado nos estados de Rondônia (BR-364) e Mato Grosso (BR-364), Amazonas (AM-010) e áreas de influência da BR-163 no Mato Grosso e Pará, onde os casos humanos, provavelmente, foram consequência dos impactos ambientais, relacionados também a outros fatores, dentre eles, a densidade populacional do roedor reservatório (MILLS et al., 1997), atividades ocupacionais e econômicas ligadas ao meio rural.

Quanto à associação dos hantavírus amazônicos encontrados nesse estudo com os biomas brasileiros e seus respectivos roedores reservatórios, associam-se: o VCAS ao roedor *Oligoryzomys utiaritensis*, nos biomas amazônico e de cerrado; vírus *Rio Mamoré-like*, cujo reservatório é o roedor *Oligoryzomys*

microtis, no bioma amazônico; vírus *Laguna Negra-like*, no cerrado, área de distribuição do roedor *Calomys callidus* e VANAJ, em roedores *Oligoryzomys aff fornesi*, na área de transição entre bioma amazônico e cerrado.

O presente trabalho servirá como suporte para estudos moleculares e epidemiológicos futuros, pois, fornece dados importantes acerca da transmissão das hantavirose na Amazônia brasileira, identificando cepas virais circulantes até então desconhecidas nos estados do Amazonas e Rondônia, confirmando a circulação de duas espécies de hantavírus, o VCAS e o vírus *Laguna Negra-like*, no estado do Mato Grosso, bem como, o VCAS no Pará, além de confirmar a circulação do VANAJ no estado do Maranhão, associado aos casos humanos.

8 CONCLUSÕES

- Na análise das sequências completas do gene N, S-RNA dos hantavírus estudados foram encontradas ORFs que podem sugerir a codificação de uma possível proteína não-estrutural NSs, com função a ser esclarecida;
- Sugere-se que o *virus Castelo dos Sonhos* (VCAS) seja o hantavírus responsável pelos casos de SPH em municípios da área de influência da BR-163 no Pará (Novo Progresso e Altamira) com circulação confirmada, pela primeira vez, no município de Garantã do Norte, Mato Grosso;
- Obteve-se pela primeira vez a sequência completa do VCAS a partir de amostra de roedor da espécie *Oligoryzomys utiaritensis* em Campo Novo do Parecis, Mato Grosso e em humano de Novo Progresso, Pará, confirmando estudos anteriores;
- O *virus Anajatuba* (VANAJ) foi o responsável pelo caso registrado em Tomé-Açu com local provável de infecção a ser esclarecido, bem como, pelo óbito proveniente do Maranhão;
- O *virus Laguna Negra-like* foi associado com o caso humano de SPH no município de Tangará da Serra, Mato Grosso, confirmando a sua circulação contínua nesse estado;
- O *virus Rio Mamoré-like* foi identificado, pela primeira vez, em roedores da espécie *Oligoryzomys microtis* nos municípios de Alto Paraíso/RO e Itacoatiara/AM, porém não associado a casos humanos;

9 REFERÊNCIAS

- AITICHOU, M., SALEH, S.S., McELROY, A.K., SCHMALJOHN, C., IBRAHIM, M.S. Identification of Dobrava, Hantaan, Seoul, and Puumala viruses by one-step realtime RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 124, n. 1-2, p. 21-26, 2005.
- ARAI, S., OHDACHI, S.D., ASAKAWA, M., KANG, H.J., MOCZ, G., ARIKAWA, J., OKABE, N., YANAGIHARA, R. Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). **PNAS**, v.105, n.42, 2008.
- BHARADWAJ, M.; BOTTEN, J.; TORREZ-MARTINEZ, N.; HJELLE B. Rio Mamore virus: genetic characterization of a newly recognized hantavirus of the pygmy rice rat, *Oligoryzomys microtis*, from Bolivia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 3, p. 368-374, Sep. 1997.
- BOHLMAN, M.C., MORZUNOV, S.P., MEISSNER, J., TAYLOR, M.B., ISHIBASHI, K., ROWE, J., LEVIS, S., ENRIA, D., ST JEOR, S.C. Analysis of hantavirus genetic diversity in Argentina: S segment-derived phylogeny. **J Virol.** v.76, n.8, p.3765-73, 2002.
- BONVINCINO, C.R., OLIVEIRA, J.A., D'ANDREA, P.S. Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos - Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008, 120p.: il. (Série de Manuais Técnicos, 11).
- BRUMMER-KORVENKONTIO, M., VAHERI, A., BONSDORFF, C. H., VUORIMIS, J., MANNI, T., PENTTINEN, K., OKER-BLOM, N., LAHDEVIRTA, J. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. **Journal of Infectious Disease**, v. 141, n. 2, p. 131-134, 1980.
- CAMPOS, G.M., BORGES, A.A., BADRA, S.B., FIGUEIREDO, G.G., SOUZA, R.L.M., MORELI, M.L. Síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus: aspectos clínicos de uma doença emergente no sudeste brasileiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.42, n.3, p.282-289, 2009.
- CASTILLO, C., MARDONES, J., VILLAGRA, E. Prevalence of anti-hantavirus antibodies in health care personnel in direct contact with patients with hantavirus pulmonary syndrome in Temuco, Chile 1997 to 1999. **Revista Médica de Chile**, v.128, n.7, p.735-739, 2000.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Hantavírus Pulmonary Syndrome – United States; update recommendation for risk reduction. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.51, p.1-12, 2002.
- CHEN, C.C., PEI, K.J.C, YANG, C.M., KUO, M.D., WONG, S.T., KUO, S.C., LIN, F.G. A possible case of hantavirus infection in a borneo orangutan and its conservation implication. **Journal of Medical Primatology**, v.40, p.2-5, 2010.

- CHILDS, J. E.; KSIAZEK T. G., SPIROPOULOU, C. F., KREBS, J. W., MORZUNOV, S., MAUPIN, G. O., GAGE, K. L., ROLLIN, P. E., SARISKY, J., ENSCORE, R. E., FREY, J. K., PETERS, C. J., NICHOL, S. T. Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as the primary rodent reservoir for a new hantavirus in the southwestern United States. **Journal of Infectious Diseases**, v.169, n.6, p.1271-1280, 1994.
- CHIZHIKOV, V. E., SPIROPOULOU, C. F., MORZUNOV, S. P., MONROE, M. C., PETERS, C. J., NICHOL, S. T. Complete genetic characterization and analysis of isolation of Sin Nombre virus. **Journal of Virology**, v.69, n. 12, p. 8132-8136, 1995.
- DELFRANO, A., TOMÉ, L., D'LIA, G., CLARA, M., ACHAVAL, J.C.R., RODONZ, R.A. Juquitiba-like Hantavirus from 2 nonrelated rodent species, Uruguai. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.9, p.1447-1451, 2008.
- DUBREUIL, V.; BARIOU, R.; DOS PASSOS, M.; FERRAND, R.; NÉDÉLEC, V. Evolução da fronteira agrícola no centro-oeste de Mato grosso: municípios de tangará da serra, campo Novo do Parecis e diamantino. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**. Brasília, v. 22, n. 2, p. 463-478, 2005.
- EASTERBROOK, J.D., KLEIN, S.L. Immunological Mechanisms Mediating Hantavirus Persistence in Rodent Reservoirs. **Plos Pathogens**, v.4, n.11, 2008.
- EISENBERG, J. F.; REDFORD K. H. **Mammals of the Neotropics**: The Central Neotropics. Chicago: University of Chicago, 1999.
- ELLIOTT, R.M., SCHMALJOHN, C.S., COLLETT, M.S. Bunyaviridae genome structure and gene expression. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v. 169, p. 91-142, 1991.
- ELLIOTT, L.H., KSIAZEK, T.G., ROLLIN, P.E., SPIROPOULOU, C.F., MORZUNOV, S., MONROE, M., GOLDSMITH, C.S., HUMPHREY, C.D., ZAKI, S.R., KREBS, J.W. Isolation of the causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v.51, n.1, p.102-8,1994.
- ELLIOTT, R. M. The *Bunyaviridae*: concluding remarks and future prospects. In: **The Bunyaviridae**. Elliott, R.M. New York: Plenum Press, 1996. p. 295-332.
- ENRIA, D., PADULA, P., ELSA, L., PINI, N., EDELSTEIN, A., POSSE, C.R., WEISSENBACHER, M.C. Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. Possibility of person to person transmission. **Medicina**, n.6, v.56, p.709-711, 1996.
- EWING, B., GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.
- FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v39, p. 783-791, 1985.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP**, Versão 3.57c Departamento de Genética, Universidade de Washington, Seattle, W.A. 2009.

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

FIGUEIREDO, L.T.M., CAMPOS, G.M., 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, p.15-27, 2001.

FERRES, M.VIAL, P., MARCO, C., YAÑES, L., GODOY, P., CASTILLO, C., HJELLE, B., DELGADO, I., LEE, S.J., MERTZ, G.J. Prospective Evaluation of Household Contacts of Persons with Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome in Chile. **The Journal of Infectious Diseases**, n.195, p.1563-71, 2007.

GAVRILOVSKAYA, I. N., SHEPLEY, M., SHAW, R., GINSBERG, M. H., MACKOW, E. R. β 3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p.7074–7079, 1998.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A Simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p.696-704, 2003.

HALL, T.A. **BioEdit**. Departamento de Microrbiologia, Estado da Carolina do Norte, Universidade, Raleigh, NC. 2001.

HINRICHSEN, S.L., GODOI, J.T. Hantavirus Disease. **Revista da Associação Médica Brasileira**, n.4, v.42, p.237-241, 1996.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MrBAYES: Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, v.14, n.294, p.2310-2314, 2001.

HJELLE, B., JENISON, S., TORRES-MARTINEZ, N., YAMADA, T., NOLTE, K., ZUMWALT, R., MACINNES, K., MYERS, G. A novel hantavirus associated with an outbreak of fatal respiratory disease in the southwestern United States: Evolutionary relationships to known hantaviruses. **Journal of Virology**, v. 68, n. 2, p. 592-596, 1994.

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

HORLING, J., CHIZHIKOV, V., LUNDKVIST, A., JONSSON, M., IVANOV, L., DEKONENKO, A., NIKLASSON, B., DZAGUROVA, T., PETERS, C.J., TKACHENKO, E., NICHOL, S. Khabarovsk virus: a phylogenetically and serologically distinct *Hantavirus* isolated from *Microtus fortis* trapped in far-east Russia. **Journal of General Virology**, v.77, n.4, p.687-694, 1996

ICTV. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Virus. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Virus** In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A., MANILOFF, J.; DESSEBERGER, U.; BALL, L.A. (eds), San Diego: Elsevier Academic press, 2005, p. 695-723.

IBGE/INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível no site: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em 01/02/2011.

IVERSSON, L.B.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; ROSA, M.D.B.; LOMAR, A.V.; SASAKI, M. G.M.; LE DUC, J.W. - Infecção humana por hantavirus no sul e sudeste do Brasil. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.40, p.85-92, 1994.

IVERSSON, L. B. Doenças humanas por hantavírus. In: **Tratado de Infectologia**. VERONESI, R.C.; FOCACCIA R. (ed.). São Paulo, Editora Atheneu, 1996. p.219-228.

JAASKELAINEN, K.M., KAUKINEN, P., MINSKAYA, E.S., PLYUSNINA, A., VAPALAHTI, O., ELLIOT, R.M., WEBER, F., VAHERI, A., PLYUSNIN, A. Tula and Puumala hantavirus NSs are functional and the products inhibit activation of the interferon-beta promoter. **Journal of Medical Virology**, v.79, n.10, p.1527-36, 2007.

JAASKELAINEN, K.M., PLYUSNINA, A., LUNDKVIST, A., VAHERI, A., PLYUSNIN, A. Tula hantavirus isolate with the full-length ORF for nonstructural protein NSs survives for more consequent passages in interferon-competent cells than the isolate having truncated NSs ORF. **Virology Journal**, v. 5, n.3, 2008.

JAKSIC, F., LIMA, M. Myths and facts on ratadas: Bamboo blooms, rainfall peaks and rodent outbreaks in South America. **Austral Ecology**, v.28, p.237–251, 2003.

JENISON, S.; HJELLE, B.; SIMPSON, S. et al. Hantavirus pulmonary syndrome: clinical, diagnostic and virologic aspects. **Seminars Respiratory Infections**, v.10. p.259-269, 1995.

JOHNSON, A.M., BOWEN, M.D., KSIAZEK, T., WILLIAMS, R.J., BRYAN, R.T., MILLS, J.N., PETERS, C.J., NICHOL, S.T. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. **Virology**, n.1, v. 238, p.115–127, 1997.

JOHNSON, A. M., SOUZA, L. T. M., FERREIRA, I. B., PEREIRA, L. E., KSIAZEK, T. G., ROLLIN, P. E., PETERS, C. J., NICHOL, S. T. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. **Journal of Medical Virology**, v.59, p.527-535, 1999.

JUNG, Y.T., KIM, G.R. Genomic characterization of M and S RNA segments of hantaviruses isolated from bats. **Acta Virologica**, v.39, n.4, p. 231-233, 1995.

KANG, H.J., ARAI, S., HOPE, A.G., COOK, J.A., YANAGIHARA, R. Novel Hantavirus in the Flat-Skulled Shrew (*Sorex roboratus*). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.10, n. 6, 2010.

KARABATSOS, N. **International Catalogue of Arboviruses, including certain other viruses of vertebrates**, 3rd. ed. Publ. The American Society for Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, Texas, 1985, p.1041.

KELLEY, L., STERNBERG, M.J.E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, v.4, n.3, 2009.

KIM, E.C., KIM, I.S., CHOI, Y., KIM, S.G., LEE, J.S. Rapid differentiation between Hantaan and Seoul viruses by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Medicine and Virology**, n.43, p. 245-248, 1994.

KIM, G.R., LEE, Y.T., PARK, C.H. A new natural reservoir of hantavirus: isolation of hantaviruses from lung tissues of bats. **Archives of Virology**, v.134, n.1-2, p.85-95, 1994.

KIM, T.Y., CHOI, Y., CHEONG, H.S., CHOE, J. Identification of a cell surface 30 kDa protein as a candidate receptor for Hantaan virus. **Journal of General Virology**, v.83, p.767-773, 2002.

KLEMPA, B., FICHET-CALVET, E., LECOMPTE, E., AUSTE, B., ANISKIN, V., MEISEL, H., DENYS, C., KOIVOGUI, L., TER MEULEN, J., KRUGUER, D.H. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.5, p.838-840, 2006.

KLEMPA, B., KOIVOGI, L., SYLLA, O., KOULEMOU, K., AUSTE, B., KRUGER, D.H., MEULEN, J.T. Serological Evidence of Human Hantavirus Infections in Guinea, West Africa. **The Journal of Infectious Diseases**, v.201, n. 7, p.1031-1034, 2010.

KUKKONEN, S.K.J.; VAHERI, A.; PLYUSNIN, A. Completion of the Tula hantavirus genome sequence: properties of the L segment and the heterogeneity in the 3' termini of the S and L genome RNAs. **Journal of General Virology**, v.79, p.2615-2622, 1998.

KRAMSKI, M., MEISEL, H., KLEMPA, B., KRUGER, D.H., PAULI, G., NITSCHKE, A. Detection and Typing of Human Pathogenic Hantaviruses by Real-Time Reverse Transcription-PCR and Pyrosequencing. **Clinical Chemistry**, v.53, n.11, p.1899-1905, 2007.

GLARSON, R.S., BROWN, D., YE, C., HJELLE, B. Peptide antagonists that inhibit Sin Nombre virus and hantaan virus entry through the beta3-integrin receptor. **Journal of Virology**, n.12,v.79, p. 7319-7326, 2005.

LE DUC, J. W., SMITH, G. A., PINHEIRO, F. P., VASCONCELOS, P. F. C., ROSA, E. S. T., MAIZTEGUI, J. I. Isolation of a Hantaan-related virus from Brazilian rats and serologic evidence of its widespread distribution in South America. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.34, n.4, p. 810-815, 1985.

LE DUC, J. W., SMITH, G. A., CHILDS, J. E., PINHEIRO, F. P., MAIZTEGUI, J. L., NIKLASSON, B., ANTONIADES, A., ROBINSON, D. M., KHIN, M., SHORTRIDGE, K. F. P., WOOSTER, M. T., ELWELL, M. R., ILBERY, P. L. T., KOECH, D., ROSA, E. S. T., ROSEN, L. Global survey of antibody to Hantaan-related viruses among peridomestic rodents. **Bulletin of the World Health Organization**, v.64, n.1, p.139-144, 1986.

LEDNICKY, J. A. Hantaviruses: a short review. **Archives of Pathology Laboratory Medical**, v. 127, p. 30-35, 2003.

LEE, H.W., LEE, P.W. Korean hemorrhagic fever. I. Demonstration of causative antigen and antibodies. **Korean Journal of Internal Medicine**, n.19, p.371-383, 1976.

LEE, H.W., LEE, P.W. Korean hemorrhagic fever. II. Isolation of etiologic agent. **Journal of the Korean Society of Virology**, v.7, p.1-9, 1977.

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. Global update on distribution of haemorrhagic fever with renal syndrome and hantaviruses. **Virus Information Exchange News**, v. 5, p. 82-84, 1988.

LE GUENNO. Identifying a hantavirus associated with acute respiratory illness: a PCR victory? **Lancet**, n.342, p.1438- 1439, 1993.

LEVIS, S. Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. **Journal of Infectious Diseases**, v.177, p.529-538, 1998.

LEVIS, S.; GARCIA, J.; PINI, N.I. Hantavirus Pulmonary Syndrome in Northwestern Argentina: Circulation of *Laguna Negra* Associated With Calomys Callosus. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v.71, n.5, p.658–663, 2004.

LOPES, VASCONCELOS H. Hantavírus no Brasil. **Revista Panamericana de Infectologia**. v.6, n.3, p. 49-50, 2004.

LÓPEZ, N., PADULA, P., ROSSI, C. , MIGUEL, S. , EDELSTEIN, A. , RAMREZ, E. , FRANZE-FERNADEZ, M.T. Genetic characterization and phylogeny of Andes virus and variants from Argentina and Chile. **Virus Research**, v.50, p.77-84, 1997.

LUNTER, G.; MIKLÓS, I.; DRUMMOND, A.; JENSEN, J.L.; HEIN, J. Bayesian coestimation of phylogeny and sequences alignment. **BMC Bioinformatics**. v.83, n.6; p.1471-2105, 2005.

MAcCAUGHEY, C., HART, C.A. Hantavírus. **Journal of Medical Microbiology**, v.49, p.587-599, 2000.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-Time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n.6, p. 1292-1305, 2002.

MAES, P., KLEMPA, B., CLEMENT, J., MATTHIJNSSENS, J., GAJDUSEK, D.C., KRÜGER, D.H., VAN RANST, M. A proposal for new criteria for the classification of hantaviruses, based on S and M segment protein sequences. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, n.5, p.813-20, 2009.

MALECKI, T.M., JILLSON, G.P., THILSTED, J.P., ELROD, J., TORREZ-MARTINEZ, N., HJELLE, B. Serologic survey for hantavirus infection in domestic animals and coyotes from New Mexico and northeastern Arizona. **Journal of the American Veterinary Medical**, n.1, v.7, p.970-3, 1998.

MARTINEZ, V.P., BELLOMO, C., SAN JUAN, J., PINNA, D., FORLENZA, R., ELDER, M., PADULA, P.J. Person-to-person transmission of Andes virus. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.12, p.1848-1853, 2005.

MENDES, W.S., ARAGÃO, N.J.L., SANTOS, H.J., RAPOSO, L., VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., ELKHOURY, M.R. Hantavirus Pulmonary Syndrome in Anajatuba, Maranhão, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n.4, v.43, p.237-240, 2001.

MENDES, W.S., DA SILVA, A.A.M., NEIVA, R.F., COSTA, N.M., DE ASSIS, M.S., VIDIGAL, P.M.O., LEITE, M.G.L., TRAVASSO DA ROSA, E.S., MEDEIROS, D.B.A., SIMITH, D.B., VASCONCELOS, P.F.C. Sorologic Survey of Hantavirus Infection, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.5, 2010.

MERTZ GJ. Bunyaviridae: Bunyaviruses, Phleboviruses, Nairoviruses, and Hantaviruses. In: RICHMANN DD; WHITLEY RJ, HAYDEN FG (eds). **Clinical Virology**, Churchill-Livingstone, New York, p. 943-972, 1997.

MILLS, JAMES N., KSIAZEK, T.G., ELLIS, B.A., ROLLIN, P.E., NICHOL, S.T., YATES, T.L., GANNON, W.L., CRAIG, E.L., ENGELTHALER, D.M., DAVIS, T., TANDA, D.T., WYATT-FRAMPTON, J., NICHOLS, C.R., PETERS, C.J., CHILDS, J.E. Patterns of association with host and habitat: Antibody reactive with Sin Nombre virus in small mammals in the major biotic communities of the southwestern United States. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.56, n.3, p.273-284, 1997.

MEYER, M. STENZEL, U., MYLES, S., PRUFER, K., HOFREITER, M. Targeted high-throughput sequencing of tagged nucleic acid samples. **Nucleic Acids Research**, v.35, n.15, 2007

MORELI, M.L., MORO DE SOUSA, R.L., FIGUEIREDO, L.T.M. Detection of Brazilian Hantavirus by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Amplification of N Gene in Patients with Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.6, p.633-638, 2004.

MORZUNOV, S.P., FELDMANN, H., SPIROPOULOU, C., SEMENOVA, V.A., ROLLIN, P.E., KSIAZEK, T.G., PETERS, C.J., NICHOL, S.T. A Newly Recognized Vírus Associated with a Fatal Case of Hantavirus Pulmonary Syndrome in Louisiana. **Journal of Virology**, v.69, n.3, p.1980-1983, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS/SVS). **Informe Técnico** (Casos de Hantavirose por Unidade Federada e Ano de Ocorrência. Brasil, 1993 – dezembro de 2006) Tabela COVEV / CGDT / DEVEP / SVS / MS, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS/SVS). **Informe Técnico** (Casos de Hantavirose por Unidade Federada e Ano de Ocorrência. Brasil, 1993 – dezembro de 2010) Tabela COVEV / CGDT / DEVEP / SVS / MS, 2010.

MULLER, R., POCH, O., DELARUE, M., BISHOP, D.H.L., BOULOY, M. Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. **Journal of General Virology**, v.75, p.1345-1352, 1994.

MURÁNYI, W., KEHM, R., BAHR, U., MÜLLER, S., HANDERMANN, M., DARAI, G., ZEIER, M. Bovine aortic endothelial cells are susceptible to hantavirus infection; a new aspect in hantavirus ecology. **Virology**, n.1, v.318, p.112-122, 2004.

NICHOL, S. T., SPIROPOULOU, C. E., MORZUNOV, S., ROLLIN, P. E., KSIAZEK, T. G., FELDMANN, H., SANCHEZ, A., CHILDS, J., ZAKI, S., PETERS, C. J. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. **Science**, v.262, p.914-917, 1993.

NICHOL, S.T.; KSIAZEK, T.G.; ROLLIN, P.E.; PETERS, C.J. Hantavirus pulmonary syndrome and newly described hantaviruses in the United States. In: ELLIOTT, R.M. **The Bunyaviridae**. New York: Plenum Press, 1996. p.69-280.

NUNES, M.R.T., BARBOSA, T.F.S., CASSEB, L.M.N., NETO, J.P.N., SEGURA, N.O., MONTEIRO, H.A.O., PINTO, E.O., CASSEB, S.M.M., CHIANG, J.O., MARTINS, L.C., MEDEIROS, D.B.A., VASCONCELOS, P.F.C. Eco-epidemiologia dos arbovírus na área de influência da rodovia Cuiabá-Santarém (BR 163), Estado do Pará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.25, n.12, p.2583-2602, 2009.

OBIJESKI JF, MURPHY FA. Bunyaviridae: recent biochemical developments. **Journal of General Virology**, n.37, p.1-14, 1977.

OGINO, M., YOSHIMATSU, K., EBIHARA, H., ARAKI, K., LEE, B., OKUMURA, M., ARIKAWA, J. Cell Fusion Activities of Hantaan Virus Envelope Glycoproteins. **Journal of Virology**, n.19, vol. 78, p.10776–10782, 2004.

OPS. Hantavirus En Las Americas. **Guia para el diagnóstico, el tratamiento, la prevención y el control**. Organización Panamericana de la Salud., 1999. 66p. (Cuaderno Técnico N° 47).

PADULA, P.J., EDELSTEIN, S.D., MIGUEL, S.D.L., LÓPEZ, N.M., ROSSI, C.M., RABINOVICH, R.D. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. **Virology**, n.2, v.241, p.323–330, 1998.

PADULA, P. J.; ROSSI, C. M.; DELLA VALE, M. O.; MARTÍNEZ, P. V.; COLAVECCHIA, S. B.; EDELSTEIN, A.; MIGUEL, S. D. L.; RABINOVICH, R. D.; SEGURA, E. L. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. **Journal Medical Microbiology**, v. 49, p. 149-155, 2000.

PADULA, P., DELLA, VALLE, M.G., ALAI, M.G., CORTADA, P., VILLAGRA, M., GIANELLA, A. Andes virus and first case report of Bermejo virus causing fatal pulmonary syndrome. **Emerg Infect Dis**, v.8, n.4,p. 437-439, 2002.

PETERS, C.J. HPS in the Americas. In: SCHELD, W.M.; CRAIG, W.A.; HUGHES, J.M. (eds). **Emerging infections**. v.2, p.17-64, 1998.

PEREIRA, L. E.; FERREIRA, K. B.; SOUZA, R. P.; SUZUKI, A.; SOUZA, L. T. M.; KATZ, G.; KHANAS ; WILLIAMS, R. J.; BURT, M. S. Serological research of rodents (Muridae, Sigmodontinae) infected by hantavirus in the State of São Paulo, Brazil. In: **National Meeting of Virology**, 10, São Lourenço, MG, Brasil. November, p. 22-25, 1998.

PEREIRA, L.E. **Estudo ecoepidemiológico de hantavírus em roedores das regiões da Mata Atlântica e Cerrado do Brasil**. 2006. 165f. Tese (Doutorado em ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

PEVZNER, P.A., TANG, H., WATERMAN, M.S. An Eulerian path approach to DNA fragment assembly. **PNAS**, v.48, n.17, 2001.

POWERS, A.M., MERCER, D.R., WATTS, D.M., GUZMAN, H., FULHORST, C.F., POPOV, V.L., TESH, R.B. Isolation and genetic characterization of a hantavirus (bunyaviridae: *hantavirus*) from a rodent, *oligoryzomys microtis* (muridae), collected in northeastern Peru. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v.61, n.1, pp.92–98,1999.

OLIVEIRA, R.C., TEIXEIRA, B.R., MELLO, F.C., PEREIRA AP, DUARTE AS, BONALDO MC, BONVICINO CR, D'ANDREA PS, LEMOS ER. Genetic characterization of a Juquitiba-like viral lineage in *Oligoryzomys nigripes* in Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v.112, n.2, p. 212-8, epub 2009.

PLYUSNIN, A.; VAPALAHTI, O.; LANKINEN, H.; LEHVÄSLAIHO, H.; APEKINA, N.; MYASNIKOV, Y.; KALLIO-KOKKO, H.; HENTTONEN, H.; LUNDKVIST, A; BRUMMER-KORVENKONTIO, M. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. **The Journal of Virology**, v.68, n.12, p.7833-7839, 1994.

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

PLYUSNIN, A. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. **Archives of Virology**, v.147, n. 4, p. 665-682, 2002.

POSADA, D.; CRANDALL, K .A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

RABONI, S. M., PROBST, C. M., BORDIGNON, J., ZEFERINO, A., SANTOS, C. N. D. Hantaviruses in Central South América: phylogenetic analysis of the S segment from HPS cases in Paraná, Brazil. **Journal of Medical Virology**. v.76, p.553-562, 2005.

RABONI, S.M., BORBA, L., HOFFMAN, F., NORONHA, L., VIOLA AZAVEDO, M.L., CARSTENSEN, S., MAZAROTTO, G.A.C.A., BORDIGNON, J., DOS SANTOS, C.N.D. Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of Brazil: Case report. **Journal of Clinical Virology**, n.2, v.45, p.153-156, 2009.

RICHTER, H., HANSON, J.D., CAJIMAT, M.N., MILAZZO, M.L., FULHORST, F. Geographical Range of Rio Mamoré Virus (Family *Bunyaviridae*, Genus *Hantavirus*) in Association with the Small-Eared Pygmy Rice Rat (*Oligoryzomys microtis*). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.10, n.6, p.613-620, 2010.

ROLLIN, P. E., KSIAZEK, T. G., ELLIOTT, L. H., RAVKOV, E. V., MARTIN, M. L., MORZUNOV, S., LIVINGSTONE, W., MONROE, M., GLASS, G., RUO, S., KHAN, A. S., CHILDS, J. E., NICHOL, S. T., PETERS, C. J. Isolation of Black Creech Canal virus, a new Hantavirus from *Sigmodon hispidus* in Florida. **Journal of Medical Virology**, v.46, p.35-39, 1995.

RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P., MrBayes: Bayesian Inference of Phylogeny, version 3. **Bioinformatics Application Note**, v.17, n.8, p.754-755, 2003.

ROTHBERG, J.M., LEAMON, J.H. The development and impact of 454 sequencing. **Nature Biotechnology**, v.26, n.10, 2008.

RUBINAS, T.C., CAREY, R.B., KAMPERT, M.C., ALKAN, S., LEDNICKY, J.A. Fatal hemorrhagic pneumonia concomitant with chlamydia pneumoniae and parainfluenza

virus 4 infection. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.128, p.640-644, 2004.

SAGGIORO, F. P., ROSSI, M. A., DUARTE, M. I., MARTIN, C. C., ALVES, V. A., MORELI, M. L., FIGUEIREDO, L. T., MOREIRA, J. E., BORGES, A. A., NEDER, L. Hantavirus infection induces a typical myocarditis that may be responsible for myocardial depression and shock in hantavirus pulmonary syndrome. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 10, p. 1541-1549, 2007.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v74,p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, M.C., LACERDA, M.V., BENEDETTI, S.M., ALBUQUERQUE, B.C., AGUIAR FILHO, A.A., ELKHOURY, M.R., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., VASCONCELOS, P.F., MEDEIROS, D.B., MOURÃO, M.P. Human hantavirus infection, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v.2, p.1165-1167, 2006.

SCHMALJOHN, C.S. Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. **Science**, v.227, p.1041-1044, 1985.

SCHMALJOHN, C. S. Bunyaviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. (eds). **Field's Virology**. 3 ed. v. 1, p. 1447-1471. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996.

SCHMALJOHN, C. Vaccines for Hantaviruses. **Vaccine**, v.27, n.4, p. D61-D64, 2009.

SCHMALJOHN, C., DALRYMPLE, J.M. Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of bunyaviridae. **Virology**, v.131, p. 482-91, 1983.

SCHMALJOHN, C., DALRYMPLE, J.M. Hantaviruses. In: **Encyclopedia of virology**. Webster, G. W., Granoff, A. (eds). London, Academic Press,1994. v. 2, p. 538-545.

SCHMALJOHN, C., HJELLE, B. Hantaviruses: a global disease problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 95-104, 1997.

SCHMALJOHN, C.S., PATTERSON, J.L. Bunyaviridae and their replication. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M. **Fundamental Virology**. 2^a.ed. New York: Raven Press, 1991. p.545-566.

SIBOLD, C., MEISEL, H., KRUGER, D.H., LABUDA, M., LYSY, J., KOSUCH, O., PEJCOCH, M., VAHERI, A., PLYUSNIN, A. Recombination in Tula Hantavirus Evolution: Analysis of Genetic Lineages from Slovakia. **The Journal of Virology**, v.73, p.667–675, 1999.

SILVA, M.V., VASCONCELOS, M.J., HIDALGO, N.T., VEIGA, A.P, CANZIAN, M., MAROTTO, P.C., DE LIMA, V.C. Hantavirus pulmonary syndrome. Report of the first three cases in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.39, p.231-234, 1997.

SILVA, D. Ministério Público Federal . *Ação Civil Pública n.96.0002121.*, mimeo. 2000.

Sites pesquisados:

http://www2.bakersfieldcollege.edu/bio16/22_Resppictures.htm. Acesso em: 20 out. 2010.

<http://www.ferias.tur.br/informacoes/7313/alto-paraiso-ro.html>. Acesso em: 20 out. 2010.

SONG, J.W., SONG, K.J., BAEK, L.J., FROST, B., PONCZ, M., PARK, K. In vivo characterization of the integrin beta3 as receptor for Hantaan virus cellular entry. **Experimental and Molecular Medicine**, v.37, p.121-7, 2005.

SONG, J.W., GU, S.H., BENNETT, S., ARAI, S., PUORGER, M., HILBE, M., YANGIHARA, R. Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*). **Virological Journal**, v.4: 114, 2007.

SWOFFORD, D. L. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods, Version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.

TERAJIMA, M., HENDERSHOT, J.D., KARIWA, H., FREDERICK, T.K., HJELLE, B.M GOADE, D., DeFRONZO, M.C., ENNIS, F.A. High levels of Viremia in patients with hantavirus pulmonary syndrome. **The Journal of Infectious Diseases**, v.180, p.2030-4, 1999.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p.4876-4882, 1997.

TISCHLER, N.D., FERNÁNDEZ, J., MÜLLER, I., MARTÍNEZ, R., GALENO, H., VILLAGRA, E., MORA, J., RAMÍREZ, E., ROSEMBLATT, M., VALENZUELA, P. D.T. Complete sequence of the genome of the human isolate of Andes virus CHI-7913: comparative sequence and protein structure analysis. **Biological Research**, v.36, p.201-210, 2003.

TORO, J., D.VEGA, J., KHAN, A.S., MILLS, J.N., PADULA, P., TERRY, W., YADÓN, Z., VALDERRAMA, R., ELLIS, B.A., PAVLETIC, C., CERDA, R., ZAKI, S., WUN-JU, S., MEYER, R., TAPIA, M., MANSILLA, C., BARO, M., VERGARA, J.A., CONCHA, M., CALDERON, G., ENRIA, D., PETERS, C.J., KSIAZEK, T.G. An outbreak of

hantavirus pulmonary syndrome, Chile, 1997. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p.687–694, 1998.

TRAVASSOS DA ROSA, E. S., MILLS, J. M. PADULA, P. J., ELKHOURY, M. R., KSI AZEK, T. G., MENDES, W. S., SANTOS, E. D., ARAÚJO, G. C. B., MARTINEZ, V. P., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., EDELSTEIN, A., VASCONCELOS, P. F. C. Newly Recognized Hantaviruses Associated with Hantavirus Pulmonary Syndrome in Northern Brazil: Parcial Genetic Characterization of Viruses and Serologic Implication of Likely Reservoirs. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.5, n.1, p.11-19, 2005.

TRAVASSOS DA ROSA, E.S. **Associação vírus-hospedeiro e epidemiologia molecular de hantavírus em distintos ecossistemas amazônicos: Maranhão e Pará – Mato Grosso**. 2008. 152f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária/Área de Ecologia e Epidemiologia) – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. Rio de Janeiro.

TRAVASSOS DA ROSA, E.S., LEMOS, E.R.S., MEDEIROS, D.B.A., SIMITH, D.B., PEREIRA, A.S., ELKHOURY, M.R., MENDES, W.S., VIDIGAL, J.R.B., OLIVEIRA, R.C., D'ANDREA, P.S., BONVINCINO, C.R., CRUZ, A.C.R., NUNES, M.R.T., VASCONCELOS, P.F.C. Hantaviruses and hantavirus pulmonary syndrome, Maranhão, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.12, 2010.

TRAVASSOS DA ROSA, E.S., MEDEIROS, D.B.A., NUNES, M.R.T., SIMITH, D.B., PEREIRA, A.S., ELKHOURY, M.R., LAVOCAT, M., MARQUES, A.A.R., VIA, A.V., D'ANDREA, P., BONVINCINO, C., LEMOS, E.R.S., VASCONCELOS, P.F.C. Pygmy rice rat as potential host of Castelo dos Sonhos Hantavirus. **Emerging Infectious Diseases**, v.ol. 17, n. 8, p.1527-1530, 2011.

TSAI, T.F. Hemorrhagic fever with renal syndrome: clinical aspects. **Laboratory Animal Science**, v. 37, n. 4, p. 419-427, 1987.

VASCONCELOS, M.I., LIMA, V.P., IVERSSON, L.B., ROSA, M.D.B., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., PEREIRA, L.E., NASSAR, E., KATZ, G., MATIDA, L.H., ZAPAROLI, M.A., FERREIRA, J.J.B. Hantavirus Pulmonary Syndrome in The Rural Area of Juquitiba, São Paulo Metropolitan Area, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v.39, n.4, 1997.

VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., RODRIGUES, S.G., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17(suplemento), p.155-164, 2001.

VINCENT, M.J., QUIROZ, E., GRACIA, F., SANCHEZ, A.J., KSI AZEK, T.G., KITSUTANI, P.T., RUEDAS, L.A., TINNIN, D.S., CACERES, L., ROLLIN, P.E., MILLS, J.N., PETERS, C.J., NICHOL, S.T. Hantavirus Pulmonary Syndrome in Panama: Identification of Novel Hantaviruses and Their Likely Reservoirs. **Virology**, v.277, p.14-19, 2000.

VIRTANEN, J.O., JAASKELAINEN, K.M., DJUPSJOBACKA, J., VAHERI, A., PLYUSNIN, A. Tula hantavirus NSs protein accumulates in the perinuclear area in infected and transfected cells. **Archives of Virology**, v.155, n.1, p.117-21, 2010.

YOUNG, J.C., HANSEN, G.R., GRAVES, T.K., DEASY, M.P., HUMPHREYS, J.G., FRITZ, C.L., GORHAM, K.L., KHAN, A., KSIAZEK, T.G., METZGER, K.B., PETERS, C.J. The incubation period of hantavirus pulmonary syndrome. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, p.714-7, 2000.

ZAKI, S. R., GREER, P. W., COFFIELD, L. M., GOLDSMITH, C. S., NOLTE, K. B., FOUCAR, K., FEDDERSEN, R. M., ZUMWALT, R. E., MILLER, G. L., KHAN, A. S., ROLLIN, P. E., KSIAZEK, T. G., NICHOL, S. T., MAHY.B. W. V., PETERS, C. J. Hantavirus Pulmonary Syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 3, p. 552-579, 1995.

ZÖLLER, L. G., YANG, S., GOTT, P., BAUTZ, E.K., DARAI, G. A novel μ capture enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant proteins for sensitive and specific diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1194-1199, 1993.

ZOU, Y., WANG, J.B., GAOWA, H.S., YAO, L.S., HU, G.H., LI, M.H., CHEN, H.X., PLYUSNIN, A., SHAO, R., ZHANG, Y.Z. Isolation and Genetic Characterization of Hantaviruses Carried by *Microtus Voles* in China. **Journal of Medical Virology**, v.80, p.680–688, 2008

ANEXO 1. Carta da diretoria do IEC aprovando a utilização das amostras para a realização do presente estudo.



AUTORIZAÇÃO

Em atenção à correspondência SIPAR de nº 25209.002819/2011-67, a qual solicita autorização para utilização de material pertencente a esta Instituição na dissertação de mestrado intitulada “**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HANTAVÍRUS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS PROCEDENTES DOS ESTADOS DE AMAZONAS E RONDÔNIA E PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO-REAL PARA HANTAVÍRUS AMAZÔNICOS**”, a ser desenvolvida pela aluna Darlene de Brito Simith, sob a orientação do pesquisador Prof. Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes, informamos a **acquiescência** quanto ao pleito solicitado conforme o preconizado no Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa/MS.

Ademais, acrescentamos que atenda todas as recomendações ou orientações complementares solicitadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa deste Instituto.

Ananindeua, Pará, 14 de abril de 2011.


Elisabeth Conceição de Oliveira Santos
Diretora do Instituto Evandro Chagas
Secretaria de Vigilância em Saúde/MS

SEÇÃO DE ARBOVIROLOGIA E FEBRES HEMORÁGICAS – FCNE: (91) 3214-2298 / FAX: (091) 3214-2299.
RODOVIA BR 316 - KM 07, SM* - BAIRRO - LEVILÂNDIA - CEP: 67.030-000 - ANANINDEUA-PARÁ.
<http://www.iec.pa.gov.br>

ANEXO 2. Publicação contendo resultados parciais da dissertação.

MEDEIROS, D.B., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., MARQUES, A., SMITH, D.B., CARNEIRO, A.R., CHIANG, J.O., PRAZERES, I.T.E., VASCONCELOS, P.F.C., NUNES, M.R.T. Circulation of hantavirus in the influence area of the Cuiabá-Santarém Highway, v.105, n.5, p.665-671, 2010.

Circulation of hantaviruses in the influence area of the Cuiabá-Santarém Highway

Daniele BA Medeiros¹, Elizabeth S Travassos da Rosa¹, Aparecido AR Marques², Darlene B Simith¹, Adriana R Carneiro¹, Jannifer O Chiang¹, Ivy TE Prazeres¹, Pedro FC Vasconcelos^{1/+}, Márcio RT Nunes¹

¹Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas ²Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia, Instituto Evandro Chagas, Rodovia BR-316 Km 7, 67030-000 Ananindeua, PA, Brasil ³Secretaria de Saúde do Estado do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil

We describe evidence of circulation of hantaviruses in the influence area of the Santarém-Cuiabá Highway (BR-163) in the Brazilian Amazon through the prevalence of specific antibodies against hantaviruses in inhabitants living in four municipalities of this area: Novo Progresso (2.16%) and Trairão (4.37%), in state of Pará (PA), and Guarantã do Norte (4.74%) and Marcelândia (9.43%), in state of Mato Grosso. We also demonstrate the ongoing association between Castelo dos Sonhos virus (CASV) and hantavirus pulmonary syndrome (HPS) cases in the Castelo dos Sonhos district (municipality of Altamira, PA) and the first report of CASV in the municipalities of Novo Progresso and Guarantã do Norte. The results of this work highlight the risk for a possible increase in the number of HPS cases and the emergence of new hantavirus lineages associated with deforestation in this Amazonian area after the conclusion of paving works on BR-163 Highway.

Key words: hantaviruses - Amazon - BR-163 Highway

Hantaviruses are the etiologic agents of the hantavirus pulmonary syndrome (HPS), a group of RNA viruses belonging to the family *Bunyaviridae*, genus *Hantavirus* (ICTV 2005). These viruses are transmitted to humans by inhalation of infected aerosols produced by dried wild rodent excrement (family Cricetidae: subfamily Sigmodontinae) (Lee et al. 1981, OPAS 1999, Nichol 1999, Figueiredo et al. 2001).

The hantavirus genome consists of a tripartite negative-sense RNA, denoted as small, medium or large, which encodes the nucleocapsid (N) protein, two envelope glycoproteins (Gn and Gc) and the viral polymerase, respectively (ICTV 2005).

The disease has been considered an important public health problem in the New World since 1993, due to the high fatality rate associated with it (LeDuc et al. 1985, 1986, Nichol et al. 1993, Iversson et al. 1994, Rosa et al. 2005, MS/SVS 2006).

In Brazil, since the first cases of HPS were reported in Jucuitaba (in 1993), state of São Paulo (SP), Southeastern Brazil (Iversson et al. 1994) and Castelo dos Sonhos, a district of Altamira municipality, state of Pará (PA), Northern Brazil (in 1995) (Johnson et al. 1999), approximately 1,209 cases of HPS were reported as of Decem-

ber 31, 2008. Of these, 20.7% (n = 232) occurred in the Brazilian Amazon region, mainly in the states of Mato Grosso (MT) and PA; however, the states of Amazonas (AM), Rondônia (RO) and Maranhão (MA) have also reported HPS cases. Furthermore, some municipalities in those states located in the influence area of the BR-163 Highway have already registered cases of HPS, such as the municipalities of Maués (AM), Altamira (districts of Castelo dos Sonhos and Cachoeira da Serra) and Novo Progresso (PA) and Marcelândia, União do Sul and Peixoto de Azevedo (MT), where the occurrence of cases in newly occupied areas has increased each year (MS/SVS 2006). Although the disease is severe, little is known about either the hantavirus species associated with HPS transmission to humans or the identity of the rodent reservoirs. Thus, this work describes new seroepidemiological information and the molecular characterisation of hantavirus lineages associated with HPS cases in the BR-163 Highway influence area, based on data obtained during field collections performed in four distinct localities of PA and MT in a longitudinal study, before the conclusion of its construction.

SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

Study area - Four study sites were selected along the Cuiabá-Santarém Highway (BR-163). Two of them were located in PA, the municipalities of Trairão (04°34'S 55°56'W) and Novo Progresso (07°08'S 55°22'W) and the other two were located in MT, the municipalities of Guarantã do Norte (09°47'S 54°55'W) and Marcelândia (11°08'S 54°36'W) (Fig. 1).

Serological investigation in the four sites - For serologic studies, a total of 2,737 blood samples were collected from people living at the four study sites: Trairão

Financial support: CNPq (MCT-CNPq/MS-SCTIE-DECIT 34/2005) INCT/MCT/CNPq/FAPESPA (573739/2008-0 300.460/2008-1), IEC/SVS/MS

+ Corresponding author: pedrovasconcelos@iec.pa.gov.br

Received 13 November 2009

Accepted 1 April 2010

(n = 686), Novo Progresso (n = 740), Marcelândia (n = 721) and Garantã do Norte (n = 590). Collection of blood specimens was carried out during three distinct seasonal periods in 2006: the period between dry and rainy seasons (April/May); dry season (August/September) and rainy season (November/December). Approximately 8-10 mL of blood were collected from patients clinically suspected of HPS and/or with undifferentiated febrile illness who spontaneously visited local Health Care Units as well as by active surveillance in the human dwellings. Blood samples were also collected from asymptomatic subjects living in local communities of the four municipalities. All participants were in agreement with the study and provided informed consent before sample collection. At the time of sample collection, activities that could lead to the risk of hantavirus infections were observed and analyzed together with epidemiological formularies used for HPS investigation, as determined by

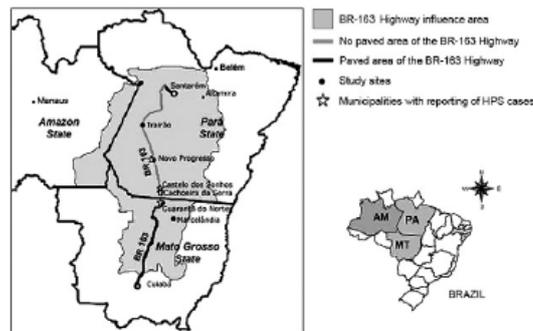


Fig. 1: map of the Amazon region, evidencing the states of Pará (PA) and Mato Grosso (MT) and showing the BR-163 Highway, which connects the municipality of Santarém, in PA, with Cuiabá, the capital of MT. The four study sites are shown (municipalities of Trairão, Novo Progresso, Garantã do Norte and Marcelândia), as well as the cities where registered cases of hantavirus pulmonary syndrome (HPS) were used in the molecular study: Castelo dos Sonhos and Cachoeira da Serra, district from municipality of Altamira, Novo Progresso and Garantã do Norte (★).

the Brazilian Health Surveillance Department/Ministry of Health (MS/SVS 2006). This study was approved by the Instituto Evandro Chagas Ethical Committee.

For the detection of hantavirus antibodies in human serum samples, IgM and IgG ELISA assays were performed using the N recombinant antigen produced for the Andes virus (Padula et al. 2000) adapted to the Ksiazek protocol (CDC/Atlanta). All samples were screened by IgG ELISA and the positive ones were later tested for the detection of IgM by ELISA.

RNA extraction and genome amplification - For the molecular study, samples from eight patients clinically suspected of having HPS with laboratory confirmation by serology (IgM positive) were selected (Table I). These samples were sent to the Evandro Chagas Institute by the municipal and/or state general offices of health during the execution of the project (2006-2008) and two samples, H 716591 and H 708928, were collected during the expedition to the sites in the municipalities of Novo Progresso and Garantã do Norte, respectively.

Viral RNA was extracted directly from blood and/or serum using the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The hantavirus genome was obtained through amplification with a two-step reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by a Nested-PCR step, as previously described by Johnson et al. (1997) and adapted by Rosa et al. (2005). First, the RT step was performed in a 10 µL reaction mixture containing 5 µL (1-5 ng) of viral RNA, 10 µM of the reverse primer (SS143C), 1X RT buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂); DTT [1 mM - 0.01% (v/v) NP-40, 50% (v/v) glycerol], 2.5 mM dithiothreitol, 20 U of RNasin RNase inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 1 µL of Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The PCR was carried out in a 25 µL reaction mixture containing 5 µL viral cDNA from RT reaction, 10 µM of the SS143C and SS1070R primers, 1X PCR buffer (0.4 mM of dNTPs, 2.4 mM MgSO₄) and 0.5 µL Platinum® Taq Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA). The RT reaction was first performed for 90 min at 42°C, followed by 35 PCR cycles, each composed of steps at 94°C for 45 s, 45°C for 1 min and

TABLE I
Samples diagnosed as hantavirus pulmonary syndrome cases used in the molecular study

State	Municipality/district	Patient	Sex	Age	Sample	Date of samples collection
Pará	Novo Progresso	H 708928	F	25	serum	5 Jun 2006
Pará	Novo Progresso	H 745332	M	53	blood	15 Mar 2008
Pará	Novo Progresso	H 745427	M	39	blood	10 Apr 2008
Pará	Altamira/Castelo dos Sonhos	H 714214	F	32	serum	6 Aug 2006
Pará	Altamira/Castelo dos Sonhos	H 695323	M	24	serum	14 Sep 2005
Pará	Altamira/Castelo dos Sonhos	H 700306	M	30	serum	9 Feb 2006
Pará	Altamira/Cachoeira da Serra	H 712177	M	36	serum	17 Aug 2006
Mato Grosso	Garantã do Norte	H 716591	M	29	serum	20 Nov 2006

72°C for 2 min. A final extension step at 72°C for 10 min was used to complete the extension. The Nested-PCR reaction was performed in a 100 µL mixture reaction, using the same protocol as the PCR step but substituting the primers for SS283C and PPT7716R and adding 10 µL of the cDNA from PCR step (diluted 1:20).

Nucleotide sequencing - The obtained amplicons (434 bp) were purified by the GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE healthcare). They were then directly sequenced in both directions using an automated sequencer ABI 377 (Applied Biosystems), the ABI Prism Dye Terminator Kit (Applied Biosystems) and the dideoxiterminator method (Sanger et al. 1977).

Sequence analysis and phylogeny - The obtained sequences were initially inspected for quality by the software SeqMan v.5.03[®] (DNA Star Inc). Phylogenetic trees were constructed by the neighbour joining (NJ) (Saitou & Nei 1987), maximum likelihood (ML) and maximum parsimony (MP) methods in the PAUP 4.0b10 (Swofford 2003). The program Modeltest version 3.6 (Posada & Crandall 1998) was used to determine which model of nucleotide substitution best explained the data using Akaike information criterion. For the NJ analysis, a distance matrix was calculated from the aligned sequences using the Tamura-3 parameter model with a different gamma distribution parameter (gamma pa-

rameter = 1.0). For the MP analysis, a transition/transversion rate of 4:1 was used. Bootstrap analyses (1,000 replicates) were implemented to place confidence values on phylogenetic groupings (Felsenstein 1985). Bayesian analysis with Markov chain Monte Carlo sampling was performed with MrBayes 3.0b4 run for two million generations and sampling on every 1,000 trees. Bayesian posterior probabilities were estimated on a 50% majority rule consensus after burn-in (Huelsenbeck et al. 2001). The TRACER program (evolve.zoo.ox.ac.uk) was used to verify if the MrBayes runs reached the appropriate convergence. Hantaviruses from the Old World were used as an out-group to give confidence on groupings.

RESULTS

Surveillance of hantavirus antibodies in the studied populations - A summary of main epidemiologic results of the four sites are presented in Table II.

Municipality of Novo Progresso - A total of 740 serum samples were collected from individuals residing in this site, corresponding to 1.89% of the estimated population (n = 39,245 inhabitants) (Nunes et al. 2009). Of these, 318 (43%) were male, with ages ranging from 2-75 years, with a mean of 24.1 years (median of 18 years); 422 (57%) were female, with ages ranging from 4-73 years, with a mean of 21.6 years (median of 16 years). Most of the male partici-

TABLE II
Hantavirus seroepidemiologic data from the four study sites in BR-163 Highway area

State	Pará		Mato Grosso		
	Novo Progresso	Trairão	Guarantã do Norte	Marcelândia	
Total of sample	740	686	590	721	
Male n (%)	318 (43)	267 (38.9)	226 (38.3)	221 (30.6)	
Female n (%)	422 (57)	419 (61.1)	364 (61.7)	500 (69.4)	
Total of samples IgG positive (positive percept) n (%)	16 (2.16)	30 (4.3)	28 (4.75)	68 (9.43)	
Male samples	IgG positive n (%)	7 (43.75)	17 (56.7)	8 (29.7)	22 (32.3)
	Mean age (years)	30.1	32.8	61.3	44
	Activities related	child and young students, agriculture worker	agriculture worker, hunting, wood extraction	agriculture worker, bricklayer	agriculture, wood extraction, local commerce
Female samples	IgG positive n (%)	6 (37.5)	13 (43.3)	19 (70.3)	46 (67.7)
	Mean age (years)	28.7	37.5	33.9	37.1
	Activities related	young students, mineral extraction, agriculture worker, wood extraction	agriculture worker, house owner activities	agriculture worker, house owner, student	domestic, agriculture worker
Sample IgM positive	3	1	1	1	
Symptomatic	2 (1 male and 1 female)	0	0	0	
Asymptomatic	1 (male)	1	1	1	

pants were adults (> 18 years old), while most individuals in the female population were children and young adults (between 10-18 years old). The most frequent activities reported in this municipality were agriculture and livestock (n = 78; 10.54%), wood extraction (n = 47; 6.65%), mineral extraction (n = 10; 1.35%), housework (n = 70; 9.46%) and other activities related to commerce and public service (16.6%) or study (n = 410; 55.4%). Sixteen (2.16%) serum samples were positive for hantavirus IgG antibodies. Of these, six were from female individuals (37.5%) with a mean age of 28.7 years, collected from two (33.3%) young students and from four (66.7%) adults with jobs related to mineral extraction, agriculture and wood extraction. Seven were male (43.75%) with a mean age of 30.1 years: one child (14.28%), two young students (28.57%) and four (57.15%) agriculture workers. Three out of the 16 individuals (18.75%) were also positive for hantaviral anti-IgM: one asymptomatic adult woman, who reported to work at a mineral extraction area, one oligosymptomatic young male agriculture worker, who reported fever, headache, chills and epigastric manifestations and one elderly woman, with a classical HPS presentation with evolution to the cardiopulmonary phase (H 708928). Correlation between IgG or IgM positive samples and the collection period was not observed.

Municipality of Trairão - A total of 686 samples were collected in this municipality (4.26% of 16,097 inhabitants) (Nunes et al. 2009). The sample pool included 267 (38.9%) obtained from male individuals and 419 (61.1%) from females. Among the male individuals, the mean age was 28.5 years and the majority of them (n = 190; 71.16%) were considered adults (ages \geq 18 years), while the female population presented a mean age of 31.6 years and ranged from 2-89 years (median of 28 years). Most females (n = 323; 77.1%) included were adults as well (\geq 18 years old). The main economic activities reported by the individuals were agriculture (n = 154; 22.45%), housework (n = 194; 57.27%), public service (n = 45; 13.93%) and retired (n = 22; 6.28%). A total of 30 out of 686 (4.37%) individuals were positive for hantaviral IgG antibodies. Most of the IgG positive reactions were found in male individuals (n = 17, 56.7%), with a mean age of 32.8 years. Eight subjects (47%) reported work activities associated with agriculture, hunting or wood extraction. Thirteen (43.3%) were IgG positive females and nine (69.23%) were adults with a mean age of 37.5 years who worked in agriculture or household chores. A single sample was IgM positive for hantavirus and was obtained from an asymptomatic retired male agriculture worker (59 years old). There was no correlation between IgG/IgM seroprevalence and the collection period.

Municipality of Guarantã do Norte - At this site, a total of 590 samples were collected: 226 (38.3%) were obtained from males and 364 (61.7%) from females. These numbers represent about 1.92% of the municipality population (n = 30,754 inhabitants) (Nunes et al. 2009). For male individuals, the age ranged from 1-43 years, with a mean age of 36.7 years (median of 36 years). Most of the individuals were considered adults, with ages \geq 18 years (n = 186). Regarding the female population, the mean

age was of 33.3 years, ranging from 3-77 years (median of 31 years). Activities reported were agriculture and livestock (n = 83; 14.07%), housework (n = 202; 34.24%), school (n = 92; 15.6%) and other activities related to commerce and public service (n = 172; 29.15%). A total of 28 individuals (4.74%) were IgG positive for hantavirus. Nineteen were female (70.3%), with a mean age of 33.9 years. The economic activities reported were agriculture (n = 2), housework (n = 6) and students (n = 7), among others. Nine were male, with a mean age of 61.3 years: three reported to be retired. Of the IgG positive samples, two were positive for IgM detection: an asymptomatic 72-year-old housewife and an adult male farmer, who presented with the clinical symptoms of HPS and an evolution to the cardiopulmonary phase (H 716591). Correlation between IgG or IgM positive results and the collection period was not observed.

Municipality of Marcelândia - A total of 721 samples were tested from this municipality, which represented 5.12% of its entire population (n = 14,084 inhabitants) (Nunes et al. 2009). Of these, 221 (30.65%) were from males with ages ranging from 11-80 years (mean age of 37.7 years; median of 36 years) and 500 (69.35%) were from females with ages ranging from 5-85 years (median of 31 years; mean age of 37.7 years). Most of the individuals were adults who reported economic activities, such as agriculture and livestock (n = 137), wood extraction (n = 17), housework (n = 279) or student (n = 77). A total of 68 (9.43%) individuals were IgG-positive for hantavirus. Twenty-two were male (mean age of 44 years) and 46 were female (mean age of 37.1 years). It is interesting to note that among the IgG-positive individuals, 14 had activities related to agriculture, one performed wood extraction, 27 were housewives and the others had activities associated with local commerce, public service or were students. A single IgM positive reaction was detected in a blood serum of a 66-year-old asymptomatic farmer. Regarding the period of sample collection, most of the IgG samples (n = 39; 57.35%) were collected in November/December, during the local rainy season.

Genetic characterisation of hantaviruses - The multiple sequencing alignments revealed high genetic similarity between the studied strains and the Castelo dos Sonhos virus (CASV) partial N gene sequence (98.3%) available in the GenBank (AF307324) and with other Brazilian strains recently sequenced from HPS cases reported in Novo Progresso and Altamira (PA) as well as in Guarantã do Norte (MT).

The phylogenetic analysis using NJ, MP and ML showed similar topology (data not shown); however, the tree building by ML presents more reliable bootstrap values and was associated with posterior probabilities generated by the Bayesian method, as shown in Fig. 2. The comparative phylogeny depicted the hantaviruses in two major clusters: New World and Old World hantaviruses. The New World hantavirus cluster was subdivided into two clades (I and II) with a genetic distance of 28.2%. Clade I included eight sub-clades: I-a (Hu39694, V strain South AH-1, Bermejo virus, Lechiguana, Neembuco

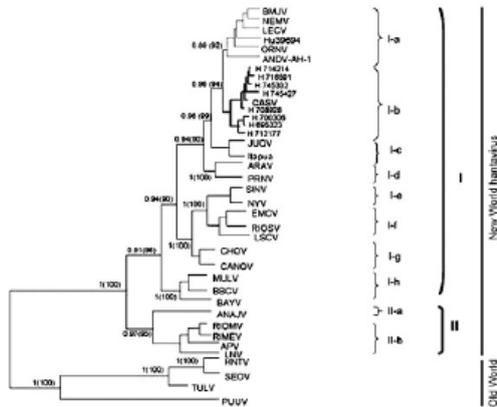


Fig. 2: phylogenetic tree of the partial small RNA segment of hantavirus lineages by maximum likelihood and Bayesian methods. Bootstrap (parenthesis) and posterior probabilities values were represented to each node. APV: Alto Paraguay; ANAJV: Anajatuba; ANDV-AH1: Hu39694 Andes south AH1; ARAV: Araraquara; BAYV: Bayou; BCCV: Black Creek Canal; BMJV: Bermejo; CANOV: Cano Delgado; CASV: Castelo dos Sonhos; CHOV: Choclo; EMCV: El Moro Canyon; HNTV: Hantaan; JUQV: Jujutiba-Araucária; LECV: Lechiguana; LNV: Laguna Negra; LSCV: Limestone Canyon; MULV: Muleshoe; NEMV: Neembuco; NYV: New York; ORNV: Oran; PRNV: Pergamino; PUUV: Puulmala; RIMEV: Rio Mearim; RIOMV: Rio Mamoré; RIOSV: Rio Segundo; SEOV: Seoul; SINV: Sin Nombre; TULV: Tula.

virus, Oran), I-b (CASV, related strains), I-c (Jujutiba/Araucária virus, Itapuã virus), I-d (Araraquara virus, Pergamino virus), I-e (Sin Nombre virus, New York virus), I-f (Limestone Canyon virus, El Moro Canyon virus, Rio Segundo virus), I-g (Choclo virus, Caño Delgado virus) and I-h (Muleshoe virus, Bayou virus, Black Creek Canal virus). Clade II (genetic divergence of 23.7%) was subdivided into two subclades: subclade II-a, represented by the Anajatuba virus and subclade II-b, which grouped Rio Mamoré virus, Rio Mearim virus, Alto Paraguay virus and Laguna Negra virus. The studied strains were included in the lineage I-b1 and were more closely related to the CASV prototype strain.

DISCUSSION

The BR-163 Highway was constructed in 1973 and connects the municipalities of Cuiabá, capital of the MT in Central Brazil, to Santarém, the main port city in the delta of Tapajós River, PA. The influence area of the BR-163 Highway is represented by an area of 1.2 million square kilometres, comprising 71 different municipalities in the southeast of PA, southwest of AM and north of the MT, in the Brazilian Amazon. The BR-163 influence area corresponds to a total of 14.4% of the national territory and 20% of the Brazilian Amazon region. In this area, different *quilombolas*, urban and rural populations and more than 30 indigenous tribes, totalling approximately two million people, live and are sustained mainly by agriculture, wood extraction, vegetal extraction and cattle grazing activities (IBGE 2007).

The emergence of hantaviruses as a potential threat to public health in the influence area of the BR-163 Highway is remarkable. Since 1995, when the first HPS case was identified in Castelo dos Sonhos, PA (Johnson et al. 1999), an increasing number of cases have been registered in 12 municipalities located near or around this Highway, in the three states under its influence area. MT ranks fourth in the amount of HPS cases reported in Brazil and first in the Pan Amazon area, with over 168 cases registered between 1999-December of 2009, in about 24 municipalities. PA ranks second in the number of cases in the Amazon region, where all HPS cases reported were located in the influence area of the BR-163 Highway (municipalities of Novo Progresso and Altamira). In both states, HPS cases were correlated to the BR-163 Highway and were clearly associated with agricultural activities, such as special grain production (particularly soybean) and deforestation for wood extraction, which are the most productive economic activities observed around the road in MT and PA. It is noteworthy that the other Amazonian states have reported HPS cases only sporadically, as observed in AM and RO (dos Santos et al. 2006, Rosa et al., unpublished observations).

The population and economic characteristics of the sampling reflect the reality of the entire population living in the four municipalities used in this study and probably also of the other municipalities in the influence area of the BR-163 Highway. The low seroprevalence of IgG antibodies in the Novo Progresso, Trairão and Guarantã do Norte (ranging from 2.16-4.75%) is in accordance with the data from Brazilian HPS cases (Holmes et al. 2000, MS/SVS 2009), while in Marcelândia, the seroprevalence was similar to that observed in the Amazon area of MA (Mendes et al. 2001, 2010), as well as in Chile (Castillo et al. 2002) and Paraguay (Ferrer et al. 1998).

The reduced prevalence of IgM antibodies, the detection of IgM antibodies in asymptomatic and oligosymptomatic individuals and the low number of HPS cases reported in the influence area of the BR-163 Highway in comparison to South and Southeast Brazilian Regions, suggest the occurrence of non severe and/or atypical hantaviral infection cases, as well as the possible undernotification of cases in the Amazon region as previously observed by Mendes et al. (2010). Moreover, until now HPS cases have not been diagnosed among people living in Municipality of Trairão. The IgM antibodies detected in an asymptomatic person signifies the recent circulation of hantaviruses in the municipality.

The prevalence of anti-hantavirus IgG antibodies in adult males observed in both sites of PA was similar to those observed in other Brazilian states (Ferreira 2003, Mendes et al. 2004, Elkhoury et al. 2005, MS/SVS 2009, Rosa et al., unpublished observations). Nonetheless, in Guarantã do Norte and Marcelândia sites the highest seroprevalence was observed among women. This fact could be explained by the high number of samples collected from women under spontaneous demand.

In the four sites, although high prevalence was observed in adults, antibodies against hantaviruses were also detected in children, young people and housewives.

These groups are not often included in hantavirus investigations. An important fact that has been considered is the participation of those groups in the subsistence agriculture in the Amazon region.

Hantavirus IgG antibodies were detected on inhabitants of Novo Progresso, Trairão and Garantã do Norte along the three periods of collection, suggesting that these places have been continuously exposed to hantaviruses. In Marcelândia municipality, high prevalence was observed during the rainy season. Similar observation has been made in municipality of Anajatuba, MA, Amazon region (Mendes et al. 2001). However, a different antibody profile has been observed in SP, where the highest seroprevalence of hantavirus antibodies occurred during the dry season (Donalisio et al. 2008). This difference could reflect the distinct ecosystems, wild rodent behaviour and economic activities in the Brazilian Amazon region and Southeastern Brazil.

The phylogenetic study confirmed the continuous circulation of CASV in municipality of Altamira since 1995 and its detection in the municipalities of Novo Progresso (PA) and Garantã do Norte (MT), suggesting that the CASV is the hantavirus associated with HPS cases in the influence area of the BR-163 Highway (Fig. 2). Therefore, the report of the CASV in MT shows the complex ecosystem in this state, which has allowed the circulation of the two different hantaviruses that infect humans: Laguna Negra-like virus associated with *Calomys* sp., which has been detected in the middle-western region of the state (Rosa et al., unpublished observations) and recognised as the main causative agent of HPS in MT and Castelo dos Sonhos, which has been associated with cases in the northern region of MT and also in PA. A recent study performed by the Instituto Evandro Chagas and the Brazilian Ministry of Health suggests that the possible natural reservoir of the CASV is a rodent from the genus *Oligoryzomys* (Rosa et al., unpublished observations).

The ongoing detection of HPS cases throughout the years in the influence area of the BR-163 Highway as well as the increase of deforestation for the establishment of agriculture, cattle grazing and wood products exploration raises the possibility of more frequent contact between humans and rodent reservoirs. Consequently, that has increased the risk of the emergence of new hantavirus lineages, the occurrence of more HPS cases and possibly large outbreaks of the disease.

Although these results did not show a significant seroprevalence of antibodies against hantaviruses that characterise serious health problem in the influence area of BR-163 Highway, the occurrence of focal outbreaks and sporadic HPS cases in this area, together with the paving of the Highway in PA, which will be performed in the next years, will probably worsen this public health panorama similarly to what happened in MT. Therefore, the continuity of this study in the influence area of the BR-163 Highway is of fundamental importance to detect early the CASV hantavirus and possibly other indigenous hantaviruses to promote an efficient surveillance, to prevent the occurrence of hantavirus infection in the inhabitants of the municipalities under the influence of

the highway and to develop a more specific diagnostic test for this important human pathogen in the Brazilian Amazon region.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Brazilian Ministry of Health, State Health Surveillance Secretariats of Pará and Mato Grosso and Municipal Health Secretariats of the municipalities of Novo Progresso, Trairão, Garantã do Norte and Marcelândia, for their support during the collection of specimens for this study, and to the people that accepted to participate in this research.

REFERENCES

- Castillo C, Sanhueza L, Täger M, Muñoz S, Ossa G, Vial P 2002. Seroprevalence of antibodies against hantavirus in 10 communities of the IX Region of Chile where hantavirus infections were diagnosed. *Rev Med Chil* 130: 251-258.
- Donalisio MR, Vasconcelos CH, Pereira LE, Avila AM, Katz G 2008. Climatic aspects in hantavirus transmission areas in São Paulo State, Brazil. *Cad Saude Publica* 24: 1141-1150.
- dos Santos MC, de Lacerda MV, Benedetti SM, Albuquerque BC, de Aguiar Filho AA, da Rosa Elkhoury M, Travassos da Rosa ES, Vasconcelos PF, Medeiros DB, Mourão MP 2006. Human hantavirus infection, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 12: 1165-1167.
- Elkhoury MR, Wada MY, Carmo EH, Luna EJA, Elkhoury ANSM, Teixeira KG, Nunes ML, Barbosa NP, Caldas EP, Caldas ACS, Marques AAR, Brito MG, Rubio GBG, Silva LP, Katz G, Delfino D, Travassos da Rosa ES, Moreira FG. Aspectos epidemiológicos da infecção e da patogenicidade por hantavirus no Brasil (2004). *Boletim Eletrônico Epidemiológico* [serial on the Internet]: 5(3): [about 5 p.]. Available from: <http://www.saude.gov.br/svs>.
- Felsenstein J 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Ferreira MS 2003. Hantavírus. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 81-96.
- Ferrer JF, Jonsson CB, Esteban E, Galligan D, Basombrio MA, Peralta-Ramos M, Bharadwaj M, Torrez-Martinez N, Callahan J, Segovia A, Hjelle B 1998. High prevalence of hantavirus infection in Indian communities of the Paraguayan and Argentinean Gran Chaco. *Am J Trop Med Hyg* 59: 438-444.
- Figueiredo LT, Campos GM, Rodrigues FB 2001. Síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavirus: aspectos epidemiológicos, clínicos, do diagnóstico laboratorial e do tratamento. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 13-23.
- Holmes R, Boccanera R, Figueiredo LT, Mançano SR, Pane C 2000. Seroprevalence of human hantavirus infection in the Ribeirão Preto region of São Paulo State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 6: 560-561.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Senso estimativo populacional realizado em 2007 [updated 2007; cited 2009 Ago 19]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/>.
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses 2005. Bunyaviridae. In CM Fauquet, MA Mayo, J Maniloff, U Desselberger, LA Ball, *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, Elsevier, San Diego, p. 695-723.
- Iverson LB, Rosa AP, Rosa MD, Lomar AV, Sasaki GM, LeDuc JW 1994. Infecção humana por hantavirus nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. *Rev Assoc Med Bras* 40: 85-92.

- Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, Peters CJ, Nichol ST 1997. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* 238: 115-127.
- Johnson AM, de Souza LT, Ferreira IB, Pereira LE, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ, Nichol ST 1999. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. *J Med Virol* 59: 527-535.
- LeDuc JW, Smith GA, Childs JE, Pinheiro FP, Maiztegui JI, Niklasson B, Antoniadis A, Robinson DM, Khin M, Shortridge KF, Wooster MT, Elwell MR, Ilbery PLT, Koech D, Rosa EST, Rosen L 1986. Global survey of antibody to Hantaan-related viruses among peridomestic rodents. *Bull World Health Organ* 64: 139-144.
- LeDuc JW, Smith GA, Pinheiro FP, Vasconcelos PF, Rosa ES, Maiztegui JI 1985. Isolation of a Hantaan-related virus from Brazilian rats and serologic evidence of its widespread distribution in South America. *Am J Trop Med Hyg* 34: 810-815.
- Lee HW, Lee PW, Baek LJ, Song CK, Seong IW 1981. Intraspecific transmission of Hantaan virus, etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, in the rodent *Apodemus agrarius*. *Am J Trop Med Hyg* 30: 1106-1112.
- Mendes WS, Aragão NJ, Santos HJ, Raposo L, Vasconcelos PF, Rosa ES, Elkhoury MR 2001. Hantavirus pulmonary syndrome in Anajatuba, Maranhão, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 43: 237-240.
- Mendes WS, da Silva AA, Aragão LF, Aragão NJ, Raposo M de L, Elkhoury MR, Suzuki A, Ferreira IB, de Sousa LT, Pannuti CS 2004. Hantavirus infection in Anajatuba, Maranhão, Brazil. *Emerg Infect Dis* 10: 1496-1498.
- Mendes WS, da Silva AA, Neiva RF, Costa NM, de Assis MS, Vidigal PM, da G L Leite M, da Rosa ES, de A Medeiros DB, de B Simith D, da C Vasconcelos PF 2010. Serologic survey of hantaviruses infection, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 16: 889-891.
- MS/SVS - Ministério da Saúde/Serviço de Vigilância Sanitária 2006. Informe Técnico. Casos de hantaviruses por unidade federada e ano de ocorrência. Brasil, 1993 - novembro de 2006. Tabela COVEV/CGDT/DEVEP/SVS/MS. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano07_n06_scp_hanta_br.pdf.
- Nichol ST 1999. Genetic analysis of hantaviruses and their host relationships. In JF Saluzzo, B Dodet, *Emergence and control of rodent-borne viral diseases*, Elsevier, Paris, p. 99-109.
- Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki S, Peters CJ 1993. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262: 914-917.
- Nunes MRT, Barbosa TFS, Casseb LMN, Nunes-Neto JP, Segura MN, Monteiro HAO, Silva EVP, Casseb SM, Chiang JO, Martins LC, Medeiros DBA, Vasconcelos PFC 2009. Eco-epidemiologia dos arbovirus na área de influência da rodovia Cuiabá-Santarém (BR-163), estado do Pará, Brasil. *Cad Saude Publica* 25: 2583-2602.
- OPAS - Organização Pan Americana da Saúde 1999. Hantavirus em las Americas. Guia para el diagnóstico, el tratamiento, la prevención y el control. OPAS, Cuaderno Técnico 47, p. 66.
- Padula PJ, Rossi CM, Della Valle MO, Martinez PV, Colavecchia SB, Edelstein A, Miguel SD, Rabinovich RD, Segura EL 2000. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. *J Med Microbiol* 49: 149-155.
- Posada D, Crandall KA 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Rosa ES, Mills JN, Padula PJ, Elkhoury MR, Ksiazek TG, Mendes WS, Santos ED, Araújo GC, Martinez VP, Rosa JF, Edelstein A, Vasconcelos PF 2005. Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in Northern Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5: 11-19.
- Saitou N, Nei M 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Swofford DL 2003. PAUP-Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Available from: www.sinauer.com/detail.php?id=8060.