

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**ESTUDO SOROLÓGICO RETROSPECTIVO SOBRE A
HANTAVIROSE NO MUNICÍPIO DE CÁSSIA DOS COQUEIROS, NO
PERÍODO DE 1986 A 1991**

SORAYA JABUR BADRA

Orientador: Prof. Dr. Afonso Dinis Costa Passos

Ribeirão Preto/SP

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ESTUDO SOROLÓGICO RETROSPECTIVO SOBRE A
HANTAVIROSE NO MUNICÍPIO DE CASSIA DOS COQUEIROS, NO
PERÍODO DE 1986 A 1991

SORAYA JABUR BADRA

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Saúde da Comunidade, Departamento de Medicina Social.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Dinis Costa Passos

Ribeirão Preto/SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto/SP

BADRA, Soraya Jabur

Estudo sorológico retrospectivo sobre a hantavirose no município de Cássia dos Coqueiros, p.47.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Saúde da Comunidade.

Orientador: Passos, Afonso Dinis Costa

1. Hantavírus. 2. Inquérito Sorológico. 3. Epidemiologia

AGRADECIMENTOS

Durante a realização desta tese contei com o apoio de muitos amigos e familiares; suas palavras de apoio sempre me incentivaram a continuar em frente, por isso agradeço a todos aqueles que estiveram presentes na elaboração deste trabalho, em especial:

A Deus, por todo amor e proteção na minha caminhada.

Meu Orientador, Dr. Afonso Dinis Costa Passos, pelo apoio, estímulo, amizade e dedicação dispensada na orientação deste trabalho. Obrigada pela confiança depositada em mim e por acreditar que isso seria possível.

Professor Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, que não só disponibilizou o Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP-USP como todo o material necessário para que fossem realizados os testes sorológicos (ELISA) nas amostras, bem como contribuiu com importantes observações.

Sueli Pereira Abramovicius, que muitas vezes realizou minhas atividades para que eu pudesse me dedicar à dissertação, mostrando-me o valor de uma verdadeira amizade.

A Helda Liz Alfonso Castro, por suas importantes correções no texto da dissertação.

A todos os amigos do Centro de Pesquisa em Virologia, com quem tive o prazer de conviver, sendo que a maior lição que aprendi foi a do companheirismo.

A Glauciane e Gilberto, que participaram ativamente na fase da realização dos testes sorológicos (ELISA) deste trabalho.

A funcionária Margarida Maria Passeri do Nascimento, que colaborou para a seleção das amostras.

Ao meu amigo Felipe Maia, por sua grande colaboração na investigação criteriosa de todos os dados clínico-epidemiológicos e sugestões finais nas análises.

Meu especial agradecimento a todas as pessoas que colaboraram como sujeitos da pesquisa.

Dedicatória

*Meus pais José Badra e Zeine Jabur
Badra (in memoriam), meus queridos
filhos Caroline e Fernando, meus
irmãos Joseine, Jorge, Rosileine e
Zeine, cunhados e sobrinhos, pelo
carinho e estímulo.*

“Os ideais que iluminaram meu caminho e sempre me deram coragem para enfrentar a vida com alegria foram a Verdade, a Bondade e a Beleza.”

Albert Einstein

RESUMO

As infecções por Hantavirus têm obtido nos últimos anos maior atenção por parte dos órgãos de saúde pública dos países da Europa, Ásia e Américas por produzirem graves doenças. No Brasil, já chegaram a 1077 os casos notificados de Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavirus (SPCVH), sendo que 70 destes ocorreram na região de Ribeirão Preto, com letalidade de 48%. Sabendo que os Hantavirus do Continente Americano só passaram a ser conhecidos a partir de 1993, interroga-se se infecções por estes agentes ocorriam no Brasil antes deste ano, o que serviu de motivação para este trabalho. Trata-se de um estudo retrospectivo sobre a situação das infecções por Hantavirus na população do Município de Cássia dos Coqueiros, região de Ribeirão Preto, SP. Com cerca de 2800 habitantes, o Município tem sua atividade econômica essencialmente agrícola, tendo mostrado, em anos recentes, grande intensidade de cultivo da gramínea *Brachiaria decumbens*. De 1999 a 2003 ali ocorreram 4 casos de SPCVH entre trabalhadores rurais. A presente investigação utilizou 1876 soros coletados entre 1986 e 1991, por ocasião de uma pesquisa sobre hepatites virais, e mantidos desde então em soroteca. Os soros foram testados para pesquisa de IgG contra Hantavirus utilizando um ELISA que tem como antígeno a proteína N recombinante do vírus Araraquara, que produziu os casos de SPCVH na região. Dentre os soros analisados, 89(4,7%) apresentaram resultados positivos, mostrando que esta infecção já ocorria, previamente à descrição dos Hantavirus americanos, e que, provavelmente, deve estar ocorrendo há muitos anos nesta região.

Palavras chave: Hantavírus, Inquérito Sorológico, Cássia dos Coqueiros

ABSTRACT

In recent years, Hantavirus infections producing severe diseases have obtained increased attention of public health authorities from countries of Eurasia and the Americas. Brazil has reported 1,077 cases of Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome (HCPS), from 1993 through 2009 and 70 of these occurred in the region of Ribeirão Preto, with a 48% fatality rate. Araraquara virus is the causative of HCPS in the region. Considering that hantaviruses causing human disease in the Americas were unknown until 1993, in this work we have looked for hantavirus infections in the region before this time. This is a retrospective serologic survey on Hantavirus infections in the population of Cássia dos Coqueiros County, region of Ribeirão Preto, SP, Brazil. Cássia dos Coqueiros, with 2,800 inhabitants, has the economy based, primarily, on agricultural economic activity, including the cultivation of *Brachiaria decumbens* grass, which is important on rodent attraction and transmission of hantavirus to man. Besides 4 HCPS occurred among rural workers in the County. For the present study, 1876 sera, collected between 1986 and 1991, were tested for IgG against Hantavirus by an ELISA using the N recombinant protein of Araraquara virus as antigen. Among the tested sera, 89 (4.7%) were seropositives. It shows that hantavirus infections occurred in Cássia dos Coqueiros, completely unknown, before the description of American hantaviruses, and, probably, these infections have been occurring for many years in this region.

Key-Words: Hantavirus, Serological Survey, Cássia dos Coqueiros

LISTA DE SIGLAS

PRNT	Teste de Neutralização por redução de placa.
SPCVH	Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavírus (Denominação dada pelo grupo do Professor Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo – FMRP USP)
HSR	Febre Hemorrágica com Síndrome Renal
SEOV	Vírus Seul.
PUUV	Vírus Puumala
HTNV	Vírus Hantaan
JUQV	Vírus Juquitiba
CASV	Vírus Castelos dos Sonhos
ARAV	Vírus Araraquara
SNV	Vírus Sin Nombre
ANDV	Vírus Andes
ANJV	Vírus Anajatuba
BAYV	Vírus Bayou
BCCB	Vírus Black Creeck Canal
BCNC	Vírus Bear Canyon
BMJV	Vírus Bermejo
BRV	Vírus Blue River
CDV	Vírus Caño Delgadito
DOBV	Vírus Dobrava
EMCV	Vírus El Moro Canyon
ISLAV	Vírus Isla Vista
LECV	Vírus Lechiguanas

LNV	Vírus Laguna Negra
PRGV	Vírus Pergamino
RMV	Vírus Mamoré
CPV-FMRP-USP	Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
PBS	Solução Salina Tamponada
PBS-TWEEN	Solução Salina Tamponada adicionada Tween-20 0,005%

TABELA

Tabela 1. Distribuição dos participantes segundo faixa etária e sexo.....	28
Tabela 2. Soropositividade para Hantavirus segundo faixa etária e sexo dos participantes.....	29
Tabela 3. Soropositividade para Hantavirus segundo o local de nascimento....	30
Tabela 4. Soropositividade para Hantavirus segundo histórico de residência....	30
Tabela 5. Soropositividade para Hantavirus segundo área de domicílio e sexo.	31
Tabela 6. Soropositividade para Hantavirus segundo faixa etária e área de localização do domicílio.....	32
Tabela 7. Soropositividade para Hantavírus segundo a escolaridade e zona de domicílio.....	33
Tabela 8. Soropositividade para Hantavirus segundo o tempo de residência em Cássia dos Coqueiros.....	34

FIGURA

- Figura 1. Representação esquemática dos membros da família *Bunyaviridae*, mostrando componentes virais. Genoma constituído por três segmentos de RNA (L, M, S), associados com a polimerase viral (proteína L); a proteína do nucleocapsídeo (proteína N); envelope viral de constituição lipoprotéica, apresentando espículas que representam as glicoproteínas Gn e Gc..... 15
- Figura 2. Distribuição dos Hantavírus do Novo Mundo Vírus, incluindo seus locais de origem, roedor-reservatório e código de acesso para a seqüência nucleotídica no GeneBank. Fonte:www.cdc.gov/hanta.... 16
- Figura 3. Ciclo biológico de transmissão dos hantavírus..... 17
- Figura 4. Placa de Elisa, mostrando na parte superior a direita os controles positivos na linha D, colunas 10,11 e 12 e na parte inferior da placa (linhas E,F,G,H, colunas 10,11,12) e superior a (linha A,B,C, colunas 10,11,12) os controles negativos. A direita na parte superior mostrando soros humanos com Ig G positivo para Hantavirus..... 26
- Figura 5. Distribuição da população por faixa etária e sexo..... 28
- Figura 6. Vista aérea da cidade de Cássia dos Coqueiros e localização deste município no Estado de São Paulo (círculo vermelho)..... 35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Histórico.....	13
1.2 Características dos Hantavírus.....	15
1.3 Roedores reservatórios dos Hantavírus.....	16
1.4 Hantavirose no Brasil.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Tipo de Estudo.....	22
3.2 População de Estudo.....	22
3.3 População de Referência.....	24
3.4 Critérios de seleção.....	24
3.5 Teste sorológico	24
3.6. Análise das informações.....	26
4. RESULTADOS.....	28
5. DISCUSSÃO.....	35
5.1. Aspectos gerais de Cássia dos Coqueiros.....	35
6. CONCLUSÃO.....	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Na literatura chinesa (LEE, 1989), desde o século XX, encontram-se citações sobre Hantavirose. Esta é uma doença zoonótica amplamente distribuída nos continentes Europeu, Asiático e Americano, e apresenta-se na forma de Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) e Síndrome Pulmonar por Hantavírus (SPH), sendo esta a única encontrada nas Américas.

Entre 1951 e 1953, às margens do rio Han, durante a guerra da Coreia, 3.200 soldados americanos desenvolveram uma doença que cursava com febre hemorrágica e síndrome renal (FHSR). A forma grave da doença caracterizava-se por febre, mialgias, manifestações hemorrágicas, insuficiência renal aguda e instabilidade hemodinâmica, levando ao óbito aproximadamente 10% das vítimas (ZEIER et al., 2005). Em meados de 1975, o vírus foi isolado a partir dos tecidos do roedor silvestre *Apodemus agrarius coreae*, capturado às margens do rio Hantaan, na Coreia do Sul. O vírus encontrado foi denominado Hantaan (LEE, 1988; LEE et al., 1978).

A FHSR é uma síndrome causada por Vírus Hantaan (HTN), Seoul (SEO), Dobrava (DOB) e Puumala (PUU), os chamados Hantavírus do Velho Mundo (CLEMENT, 2003). Estes vírus afetam mais de 200.000 pessoas a cada ano na Europa e na Ásia (ZEIER et al., 2005).

Em 1984, foi observado o primeiro indício da presença de Hantavirus nas Américas, nos Estados Unidos, quando se encontraram anticorpos para Hantavirus no roedor silvestre *Microtus pensilvanicus* (YANAGIHARA et al., 1985; LEE et al., 1981).

Em maio de 1993, um Hantavírus desconhecido emergiu nos Estados Unidos da América, na região de *Four Corners* (Novo México, Arizona, Colorado e Utah), causando uma epidemia de doença respiratória aguda que foi denominada Síndrome Pulmonar por Hantavírus (SPH), com alta letalidade entre os índios navajos (NICHOL et al., 1993). O agente etiológico da SPCVH nos Estados Unidos, isolado do roedor silvestre *Peromyscus maniculatus*, foi denominado *Sin Nombre* (SNV) (NICHOLS et al., 1993). Desde então, a doença passou a ser associada a

outros Hantavirus americanos na Argentina, Chile, Uruguai, Paraguai e Brasil, recebendo então a denominação de Síndrome Pulmonar Córdiovascular por Hantavírus – SPCVH– (JOHNSON et al., 1999; MONROE et al., 1999; PINI, 2004; DELFRARO et al., 2003; BAYARD et al, 2004; CAMPOS et al., 2003; FIGUEIREDO, 1999; FIGUEIREDO, 2003).

Além do SNV, na América do Norte descobriram-se outros tipos de Hantavirus associados à SPCVH, como o New York, Bayou, El Moro Canyon, Blue River, Muleshoe, Monongahela e Black Creek Canal. Na América Central, descobriram-se os vírus Rio Segundo e Choclo. Na América do Sul, encontraram-se os vírus Andes, Rio Mamoré, Caño Delgadito, Oran, Laguna Negra, Lecchiguanas, Pergamino e Maciel. Particularizando para o Brasil, foram descobertos os vírus Juquitiba, Castelo dos Sonhos, Araraquara e Anajatuba (NICHOL et al., 1993; HJELLE et al., 1995; MORZUNOV et al., 1995; RAVKOV et al., 1995; JOHNSON et al., 1997; LÓPEZ et al., 1996; LEVIS et al., 1998; MONROE et al., 1999; JOHNSON et al., 1999; MENDES et al., 2001; RABONI et al., 2005; SOUZA et al., 2008). A figura 1 mostra a distribuição destes agentes no continente americano.

No Brasil, ocorreu interesse por estas viroses no início da década de 1980. Foram realizados vários inquéritos sorológicos em populações humanas e de roedores, detectando-se soros reagentes contra vírus Hantaan e Seoul (IVERSSON et al., 1994, LEDUC et al., 1985; VASCONCELOS et al., 1997). A ampla distribuição desses vírus em roedores domésticos e peridomésticos sugeria a existência da hantavirose em regiões situadas fora dos seus limites geográficos até então conhecidos (LEDUC et al., 1985; LEE et al., 1982). Ainda mais, outros estudos soropidemiológicos para detecção da infecção por Hantavirus confirmaram a ocorrência da infecção no Brasil (HINDRICHSEN et al., 1993; IVERSSON et al., 1994; NUNES-ARAUJO et al., 1999; HOLMES et al.; 2000; ROMANO-LIBER et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2003; MENDES et al., 2004.

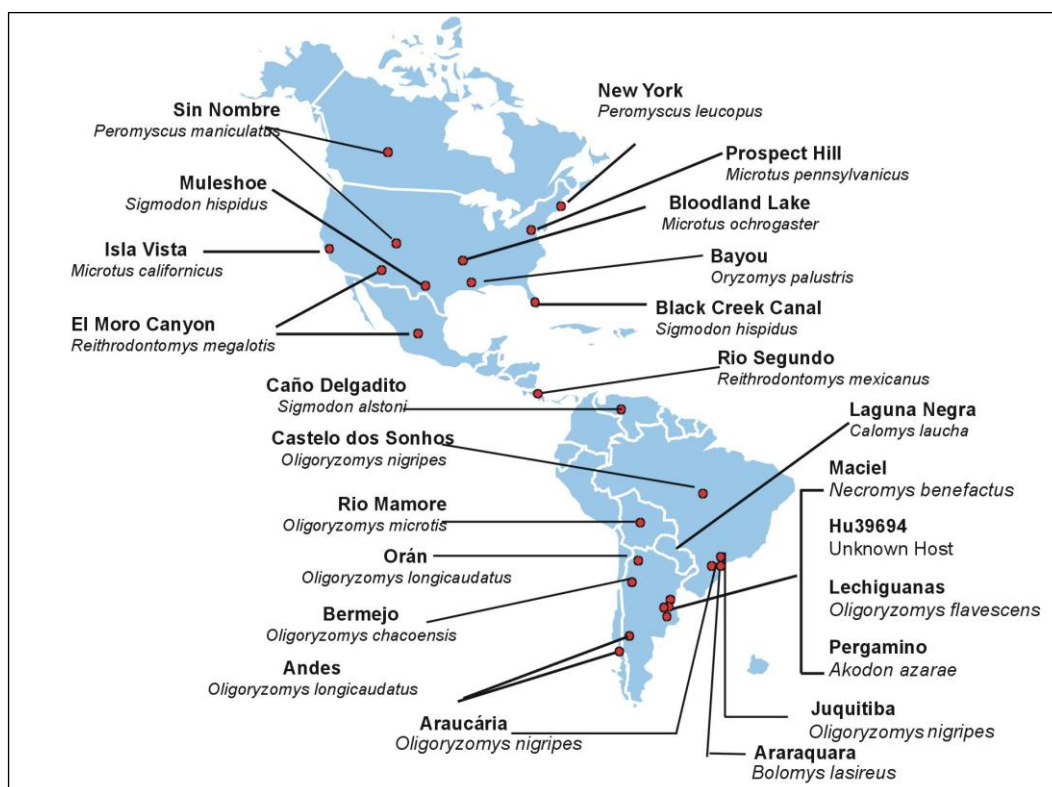


Figura 1 – Distribuição de alguns Hantavírus do Novo Mundo, incluindo seus locais de origem e roedores-reservatórios.
Fonte: www.cdc.gov/hanta.

1.2 Características dos Hantavírus

Os Hantavírus compreendem um dos gêneros da família *Bunyaviridae*. Esta família, em sua maioria, agrupa vírus diversos, transmitidos por mosquitos, flebótomos e carrapatos, os quais se distribuem em quatro gêneros: *Orthobunyavirus*, *Nairovirus*, *Phebovirus* e *Tospovirus* (MERTZ, 1997). Fazem exceção, quanto à transmissão arbovívica, os vírus pertencentes ao gênero *Hantavirus*, que incluem agentes associados a roedores (ordem *Rodentia*, família *Muridae*). Os Hantavírus são vírus envelopados, de simetria helicoidal e formato esférico, com diâmetro variando de 80 a 120 nm. Estes vírus possuem na sua superfície projeções glicoprotéicas denominadas Gn e Gc e, internamente, uma ribonucleoproteína envolvente dos RNAs virais, arranjada de forma circular (Figura 2) (GOLDSMITH et al., 1995; LEDNICKY, 2003). O genoma dos Hantavírus é constituído por três segmentos de RNA de fita simples e polaridade negativa, denominados grande (L), que codifica a enzima polimerase de RNA dependente de

RNA; médio (M) que codifica as glicoproteínas Gn e Gc da superfície viral, e pequeno (S), que codifica a proteína do nucleocapsídeo que envolve o RNA viral (SCHMALJOHN & HOOPER, 2001). (Figura 2).

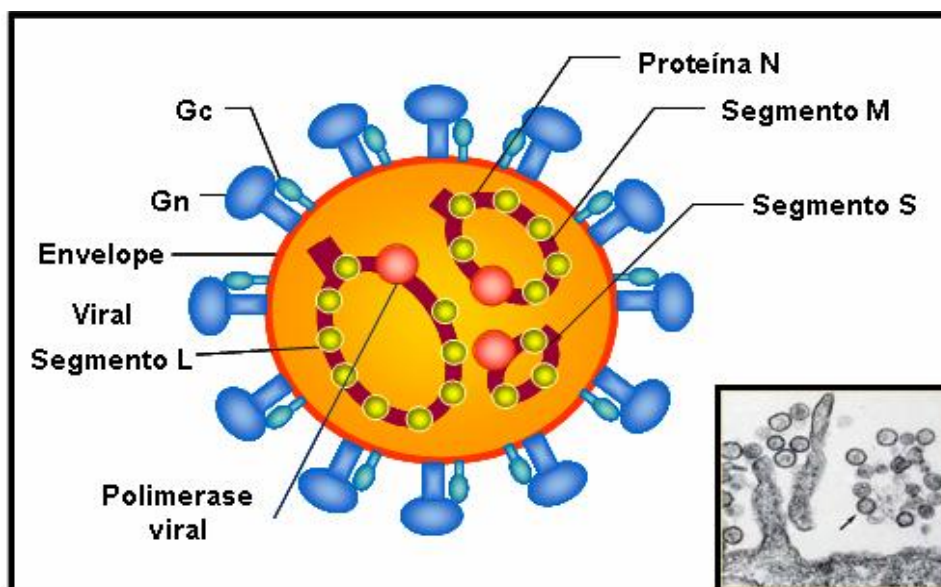


Figura 2. Representação esquemática dos membros da família *Bunyaviridae*, mostrando componentes virais. Genoma constituído por três segmentos de RNA (L, M, S), associados com a polimerase viral (proteína L); a proteína do nucleocapsídeo (proteína N); envelope viral de constituição lipoprotéica, apresentando espículas que representam as glicoproteínas Gn e Gc. Fonte: adaptado de MEDEIROS, 2004.

O canto direito inferior da figura 2 mostra eletromicrografia eletrônica de transmissão de células infectadas com o vírus *Hantaan*, observando-se partículas virais (seta) com morfologia similar aos integrantes da família *Bunyaviridae* (Fonte: CDC).

1.3 Roedores-Reservatórios de Hantavírus

Os Hantavírus são transmitidos ao homem pelo contato com aerossóis em locais onde roedores infectados eliminaram seus excretas contendo o vírus (LEE, et al., 1981; LEE, et al., 1982; LEE, 1988; NICHOL, 1999). (Figura 3). Outras formas naturais de transmissão à espécie humana incluem contato físico direto com os roedores, como ocorre na mordedura (SCHMALJOHN & HJELLE, 1997; SIMMONS & RILEY, 2002). A primeira evidência de transmissão inter-humana por Hantavírus

nas Américas foi verificada no sul da Argentina durante um surto de SCVPH causado pelo vírus *Andes* (ANDV), durante o qual profissionais de saúde apresentaram risco maior de se infectar do que o observado na população geral. Casos de transmissão pessoa a pessoa foram descritos tanto na Argentina como no Chile (PADULA et al., 1998; MARTINEZ et al., 2005).

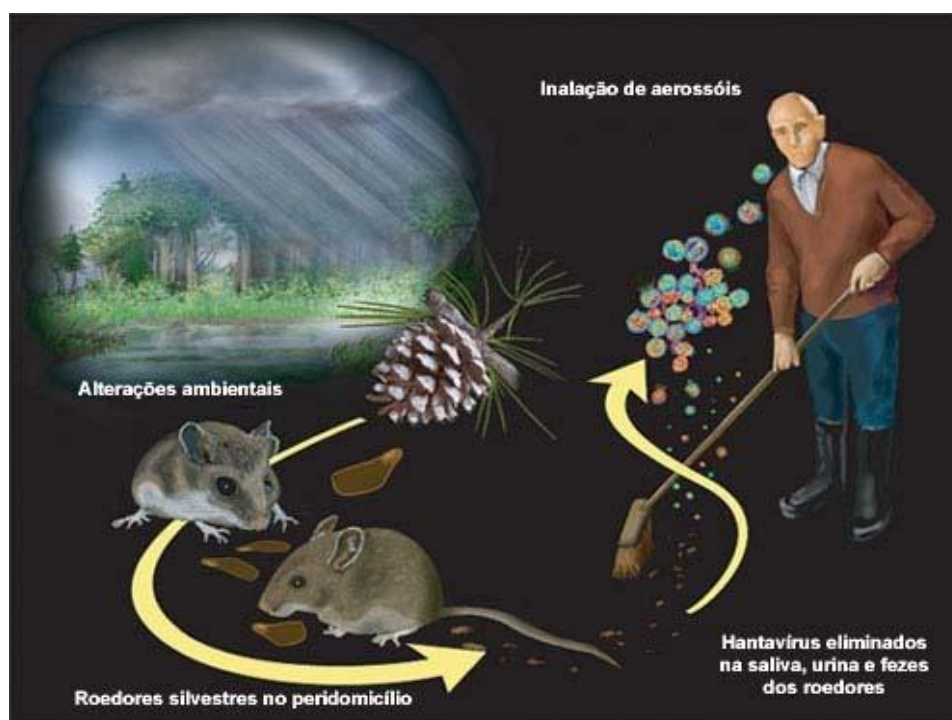


Figura 3-Ciclo biológico de transmissão dos hantavírus.
(adaptado de <http://www.nsf.gov/news/specialreports/ecoinf/solved.jsp>).

Sabe-se que os roedores-reservatórios de Hantavirus no Brasil são *Necromys lasiurus*, associado ao Hantavirus Araraquara; *Oligoryzomys negripis*, associado ao Hantavirus Juquitiba (JUQV); *Holochilus sciureus*, associado ao Hantavirus Anajatuba (ANJV); e o *Oligoryzomys fornesi*, associado ao Hantavirus Rio Mearim (RIMEV) (SIMMONS & RILEY, 2002; PETERS & KHAN, 2002; LEDNICKY, 2003; JOHNSON et al., 1999; MONROE et al., 1999).

Existe uma teoria clássica segundo a qual estes vírus são mantidos na natureza infectando roedores, dos quais são patógenos ancestrais (ordem Rodentia, família Cricetidae) e que com eles teriam co-evoluído (SCHMALJOHN & HJELLE, 1997; SCHMALJOHN et al., 1985). Esta teoria sofreu forte abalo recentemente com os achados de RAMSDEN et al (2008), sugerindo que os Hantavirus não teriam co-

evoluído com seus roedores ancestrais. Através da determinação das taxas evolutivas dos Hantavirus e dos roedores, os autores mostraram que a evolução dos primeiros é 10.000 vezes mais rápida que a dos últimos. Também, mostraram que os Hantavirus teriam surgido entre 300 e 600 anos atrás e que teriam entrado no Continente Americano há cerca de 200 anos infectando a família *Sigmodontinae*. (RAMSDEN et al., 2008). Concluem que os Hantavirus estariam em processo de expansão entre as espécies de *Sigmodontinae* presentes no continente americano e que isso influenciaria o comportamento destes roedores, bem como o contato deles com os seres humanos.

1.4 Hantavirose no Brasil

Inquéritos sorológicos populacionais em seres humanos e roedores foram realizados no Brasil, na década de 1980. Anticorpos para Hantavirus foram encontrados em ratos capturados em Recife-PE, São Paulo-SP e em Belém-PA, com prevalências variando de 6 a 56% (LEDUC et al., 1985). Em 1983, obteve-se o primeiro isolamento de um *Hantavirus* na América do Sul, a partir das vísceras de um *Rattus norvegicus* capturado em Belém, que na sua identificação mostrou-se antigenicamente relacionado ao vírus *Seoul* (LEDUC et al., 1985). No Brasil, em 1990, anticorpos específicos para o vírus *Seoul* foram detectados em pacientes com diagnóstico de leptospirose em Recife, e anticorpos para o vírus *Hantaan* e *Puumala* nas cidades de São Paulo e Paranaguá, esta última no Estado do Paraná, caracterizando a circulação deste ou outros Hantavirus no país (IVERSSON et al., 1994). Em 1991, durante investigação etiológica de sete óbitos por febre hemorrágica ocorridos em Manaus, AM, 80 soros de familiares e vizinhos foram testados para Hantavirus e seis exibiram títulos elevados, sugerindo circulação endêmica silenciosa desses vírus na região (VASCONCELOS et al., 1992). IVERSSON e colaboradores (1994), realizaram pesquisa de anticorpos IgG e IgM utilizando ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e testes de neutralização por redução de placa (PRNT) para *Seoul* (SEOV) e *Puumala* (PUUV), e imunofluorescência indireta (IFI) para o vírus HTNV. Foram analisados 1063 soros de roedores silvestres, de 1986 a 1990, e também estudaram-se grupos humanos dos estados de São Paulo e Paraná que apresentaram estreito contato com ratos urbanos ou

com roedores silvestres (IVERSSON et al., 1994). Anticorpos foram detectados em 32 pessoas, sendo que, em cinco, o PRNT foi positivo. Também, numa série de 212 soros de pacientes com suspeita de leptospirose da região norte do Brasil, encontraram-se anticorpos IgG para o vírus Hantaan, em 8,4%, e IgM em 1,9% (VASCONCELOS et al., 1997).

Em 1993, três casos de SCVPH foram diagnosticados na área rural de Juquitiba, Estado de São Paulo, constituindo o primeiro registro clínico desta doença no Brasil. Este Hantavirus foi denominado Juquitiba (JUQV) (IVERSSON et al., 1994; DA SILVA et al., 1997; FIGUEIREDO et al., 1999).

Ainda, outros estudos soroepidemiológicos para a detecção da infecção por Hantavirus foram realizados, confirmando a ocorrência dessas no Brasil (HINDRICHSEN et al., 1993; IVERSSON et al., 1994; NUNES-ARAUJO et al., 1999; HOLMES et al., 2000; ROMANO-LIBER et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2003; MENDES et al., 2004).

Em 1998, uma avaliação sorológica em 379 estudantes de Salvador mostrou uma positividade para *Hantaan* de 13,2%. Todas as amostras foram negativas para *Sin Nombre*, sugerindo infecção precoce por *Hantaan* ou outro hantavírus associado (MASCARENHAS-BATISTA et al., 1998). Aparentemente, a soropositividade observada nestes estudos não reflete a infecção por Hantavirus americanos, já que nestes locais nunca se relatou a SPCVH.

Outros pacientes com Hantavíroses foram notificados, entre 1993 e 1997, em Franca e Araraquara, Estado de São Paulo, e em Castelo dos Sonhos, Estado do Mato Grosso (JOHNSON et al., 1999). Os estudos moleculares realizados a partir de materiais destes pacientes resultaram na detecção genômica de mais dois Hantavírus: Castelo dos Sonhos (CASV) e Araraquara (ARAV).

Na região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, em 1999, Figueiredo et al. divulgaram dois casos fatais de SCPVH em Guariba, localizada a 40 km da cidade de Ribeirão Preto. Estes casos foram diagnosticados por ELISA, com base na detecção de IgM específica para antígeno de SNV. Estes casos originaram um interesse pela Hantavírose na região que vem se mantendo até os dias de hoje, com a realização de diversos estudos. Em 1999, realizou-se um inquérito para Hantavirus (antígeno de SNV) na região de Ribeirão Preto, detectando soropositividade de 1,23% (HOLMES et al., 2000). De 1998 a 1999 foram confirmados cinco casos de

infecção por Hantavírus nesta região, sendo dois em Guariba, um em Jardinópolis, um em Cajuru e um em Cássia dos Coqueiros (HOLMES et al., 2000). Portanto, até 2003, quatro casos de SPCVH já haviam ocorrido no município de Cássia dos Coqueiros, permitindo estudar a sintomatologia e determinar a definição de caso suspeito (JOHNSON et al., 1999; HOLMES et al., 2000).

Também em 2003, Campos et al. observaram que 14,3% da população de Jardinópolis-SP era soropositiva para Hantavirus. Araújo et al. (2003) realizaram inquérito soropidemiológico para Hantavirus entre roedores silvestres capturados nos Estados do Maranhão (município de Anajatuba) e Mato Grosso (município de Tangará da Serra). Dos 104 roedores capturados em Anajatuba, 20,2% foram positivos para o antígeno SNV, por ELISA. Em Tangará da Serra, dos 126 roedores capturados, oito foram soropositivos para Hantavirus, todos pertencentes às espécies de roedores que podem atuar como reservatório para Hantavirus em diferentes regiões do país. Posteriormente, em 2004, SUZUKI et al. demonstraram que o ARAV está associado ao roedor *Necromys lausurus* e que o JUQ está associado ao *Oligoryzomys nigripes*. No mesmo ano, observou-se que o Hantavirus implicado com a SPCVH na região de Ribeirão Preto era o ARAV. Esta virose também foi observada no roedor *Necromys lasiurus*, suposto reservatório do ARAV (SOUZA et al., 2008).

Sabe-se hoje que cinco linhagens de Hantavirus foram associados à maioria dos casos documentados de SPCVH, sendo estes os Vírus Juquitiba (JUQV), Araraquara (ARAV), Laguna Negra, Castelo dos Sonhos e o vírus de Anajatuba. Os casos de SPCVH relatados no norte e nordeste do Brasil foram causados provavelmente por outros Hantavirus desconhecidos (FIGUEIREDO et al., 2009). No período de 1986 a 1990, um amplo estudo epidemiológico para hepatite foi realizado em Cássia dos Coqueiros, tendo sido obtidas 1951 amostras de sangue (PASSOS ADC, 1993). Alíquotas da grande maioria dessas amostras foram mantidas em soroteca no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, o que ensejou a oportunidade de realização de uma investigação sobre hantavirus vinte anos após a coleta do material, a qual ocorreu em momento anterior ao reconhecimento da hantavirose como problema de saúde pública no Brasil.

2. OBJETIVOS

1. Investigar a possível circulação de Hantavirus na área de Cássia dos Coqueiros no período anterior ao seu reconhecimento como problema clínico no Brasil.
2. Estimar a frequência de anticorpos contra Hantavirus em amostras de soro da população de Cássia dos Coqueiros, Estado de São Paulo, no período de 1986 a 1991.
3. Estudar possíveis associações entre presença de anticorpos contra Hantavirus e características sociais, demográficas e profissionais dos participantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da FMRP (processo nº 6998/2007). Ocorreu dispensa da exigência do termo de consentimento livre e esclarecido, uma vez que o longo tempo decorrido entre a coleta dos dados e o momento atual inviabilizaria, na prática, o preenchimento de tal instrumento.

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo epidemiológico descritivo, transversal, com levantamento retrospectivo.

3.2 População de estudo

Foram estudadas amostras séricas de moradores do município de Cássia dos Coqueiros, coletadas entre 1986 e 1981, através de um inquérito realizado em todos os bairros urbanos e em todas as localidades rurais. Na ocasião, haviam sido obtidas amostras de 1951 habitantes com idade igual ou superior a um ano, correspondendo a 69,7% do total de moradores estimados à época. Na realização do inquérito foram visitados todos os domicílios, procurando-se envolver na pesquisa o maior número possível de participantes.

À época, a inclusão dos participantes incluiu as seguintes atividades:

Inicialmente, foi realizada uma visita aos domicílios da área urbana por um funcionário do Centro Médico Social Comunitário Pedreira de Freitas (CMSCPF), pertencente à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e que representa a única unidade de atenção médica aos moradores do município. Nessa visita ele explicava em linhas gerais os objetivos da investigação e convidava as pessoas acima de um ano de idade a comparecerem ao Centro em dias pré-determinados, para serem incluídas no trabalho. Posteriormente, o convite passou a ser feito pessoalmente pelo autor da investigação, nos dias em que ele se encontrava no CMSCPF, aos indivíduos que por qualquer razão procuravam assistência médica. Eram explicados os objetivos do trabalho e os passos que seriam dados na sua execução, deixando

claro que a participação era voluntária. Também foram utilizados outros meios disponíveis na comunidade, tais como: serviço de alto falante da prefeitura, divulgação através de jornal de circulação na cidade, colaboração dos professores da escola, colaboração dos motoristas de ônibus escolares e anúncios divulgados na igreja.

Para os participantes foi aplicado um questionário individual padronizado visando detectar a presença de fatores de risco para hepatite B. Este questionário foi aplicado em cerca de 95% dos casos pelo autor da investigação, em dias variados. Os outros 5% foram aplicados por alunos da última série do curso médico da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto que cumpriam estágio obrigatório de Medicina Comunitária em regime de internato, nas dependências do CMSCPF. Estes estudantes foram previamente treinados e a aplicação do questionário individual foi feita dentro da Unidade no período entre outubro de 1987 e agosto de 1989. Entre setembro de 1989 e maio de 1990, a aplicação se fez nos domicílios localizados fora da área urbana, uma vez que neste período foi promovida uma busca ativa dos habitantes da zona rural que se encaixavam nos critérios de inclusão mas que ainda não haviam sido investigados. O preenchimento do formulário individual permitiu levantar grande quantidade de informações de natureza sócio-demográfica e fatores de risco para hepatite B.

A classificação entre áreas urbana e rural seguiu o seguinte critério:

- Urbana - quando o domicílio se encontrava dentro dos limites do perímetro urbano, definido como o setor 17 do reconhecimento geográfico da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) da Secretária de Saúde do Estado de São Paulo.
- Rural - quando domicílio se encontrava fora dos limites acima descritos, porém dentro do território do município. Portanto, foram considerados como rurais os domicílios situados em qualquer outro setor que não o 17.

Após a realização dos exames sorológicos para hepatite B, objeto de interesse da investigação da época, foram estocadas alíquotas das amostras em uma soroteca mantida no Laboratório de Sorologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Das 1951 pessoas originalmente

incluídas, não foi possível obter material suficiente para exame sorológico para hantavirus em 55. Portanto, a população de estudo da investigação atual corresponde a 1896 indivíduos acima de um ano de idade que, entre 1986 e 1990, habitavam Cássia dos Coqueiros e concordaram em ter o seu sangue coletado.

3.3 População de referência

A totalidade dos moradores das áreas urbana e rural do município de Cássia dos Coqueiros, residente no período de 1986 a 1990.

3.4 Critérios de seleção

1. Ter idade igual ou superior a um ano e concordar com a sua participação após ter conhecimento dos objetivos e metodologia da investigação. No caso de menores de idade, exigia-se a concordância dos pais ou responsáveis.
2. Habitar dentro dos limites geográficos do município de Cássia dos Coqueiros.

3.5 Teste sorológico

Para detecção de anticorpos contra Hantavirus optou-se pelo método sorológico de IgG-ELISA indireto utilizando antígeno recombinante de proteína N do Hantavirus Araraquara (FIGUEIREDO et al., 2009). Os testes foram realizados no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Para realização do teste foram utilizadas as seguintes soluções:

- a. solução tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH = 9,6, com o propósito de realizar a diluição da proteína recombinante e controle negativo. Para o processo de lavagem das placas, foi preparada uma solução tampão PBS 10x, pH 7,4 contendo Tween 0,5 % (PBST).
- b. solução de HCl 1 M, a qual foi utilizada no processo de bloqueio da reação do substrato.

O Teste EIA - IgG

Inicialmente a placa de ELISA foi sensibilizada da seguinte maneira: a parte superior (linhas A, B, C, D, da coluna 1 a 12) continham a proteína N recombinante do Hantavirus Araraquara, expressa em *Escherichia Coli*, previamente diluída em solução tampão carbonato, pH 9,6. Na parte inferior (linhas E, F, G e H, da coluna 1 a 12), adicionou-se o antígeno controle negativo, contendo apenas um extrato de *E. coli* diluído na mesma solução tampão carbonato-bicarbonato (FIGUEIREDO et al., 2009). As concentrações do antígeno de Hantavirus (proteína N recombinante de ARAV) e do antígeno negativo foram de 2 µg/mL, em 50 µL/orifício. Após adição dos antígenos aos orifícios das placas, estas foram incubadas em câmara úmida até o dia seguinte, quando foram lavadas por 5 vezes com PBS pH = 7,4 acrescido de Tween a 0,05 % (PBST). Em seguida, a placa foi bloqueada com leite em pó desnatado (Molico, Nestlé Brasil) a 10% em PBS, no volume de 200 µL/orifício e incubada por 2 horas a 37°C.

Processaram-se os soros humanos na diluição 1/100, tendo sido usados como controle um soro de referência positivo e um negativo. O diluente utilizado foi o mesmo da solução bloqueio. Os soros em teste foram adicionados à placa em duplicata, tanto para o antígeno de Hantavirus (linhas A1 até A9; B1 até B9; C1 até C9 e D1 até D9), como para o antígeno negativo (linhas E1 até E9; F1 até F9; G1 até G9 H1 até H9). Os controles positivos foram adicionados em diluições únicas nos poços das linhas, (D9 até D12) e (H9 e H10), nas diluições 1/100. Também, os soros controle-negativo foram adicionados em quadruplicata em poços das linhas, (A9 até A12), (B9 até B12) e (C9 até C12), assim como nos poços inferiores, (E9 até E12, F9 até F12, G9 até G12), no volume de 50 µL/orifício. Em continuação, a placa foi novamente incubada por uma hora a 37° C em câmara úmida, lavada em seguida por seis vezes e posteriormente adicionado 50 ul/orifício suspensão de anticorpos caprinos anti-IgG humano conjugados à peroxidase (SIGMA, USA) diluída a 1:2000. A placa foi incubada por uma hora e realizada a última lavagem por seis vezes com PBST. Finalmente, foi adicionado o substrato ABTS (KPL,USA) para a revelação de da placa, na quantidade de 100ul por orifício. A placa foi coberta com papel alumínio e incubada por 15 a 20 minutos em estufa a 37°C e em câmara úmida. Após surgimento de cor, a reação foi bloqueada com 50µL de solução de HCl 1 M. A leitura

da placa foi realizada em aparelho de espectrofotometria em um filtro de 405 nm (Titertek Multiskan, Flow, Finlândia).

As DOs obtidas de soros positivos tiveram subtraídos os valores das DOs obtidas com os mesmos soros reagindo frente ao antígeno negativo, resultando no que é denominado DO líquida. Para determinação do ponto de corte que indicou os soros positivos, a média das DOs líquidas dos soros controle-negativo foi acrescida de 3 desvios-padrão (SOUSA et al., 2008). Foram considerados soros positivos aqueles cujas DOs líquidas foram maiores que o valor do ponto de corte.

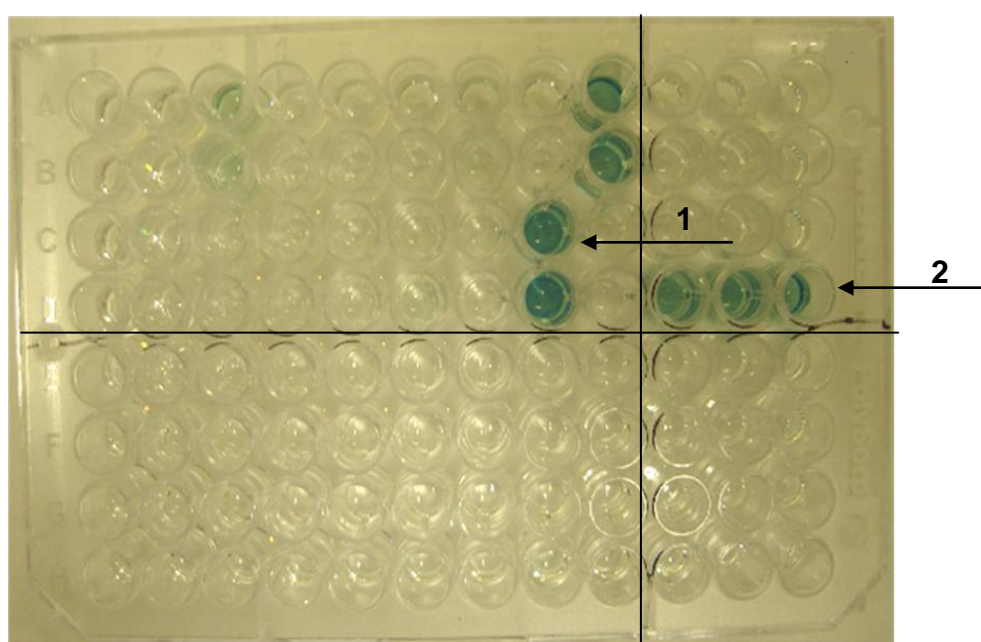


Figura 4: Placa de Elisa Indireto para detecção de anticorpos IgG contra Hantavírus. A placa foi sensibilizada com antígeno da proteína N recombinante para Hantavírus acima da linha preta horizontal e abaixo da mesma com extrato de *Escherichia coli*, que representa os controles negativos das amostras. A seta 2 mostra um soro referência IgG positivo, usado como controle. A seta 1 mostra soros positivos para Hantavírus da população estudada.

3.6 Análise das informações

Os resultados dos testes sorológicos para Hantavirus foram inseridos no banco de dados original, criado para o estudo das hepatites virais. As informações foram transferidas para o pacote Stata 9.0 (Statistical Software for professionals, version 9,0, USA), sendo representadas através de tabelas e figuras. Para os valores estimados de prevalência foram calculados os respectivos intervalos de

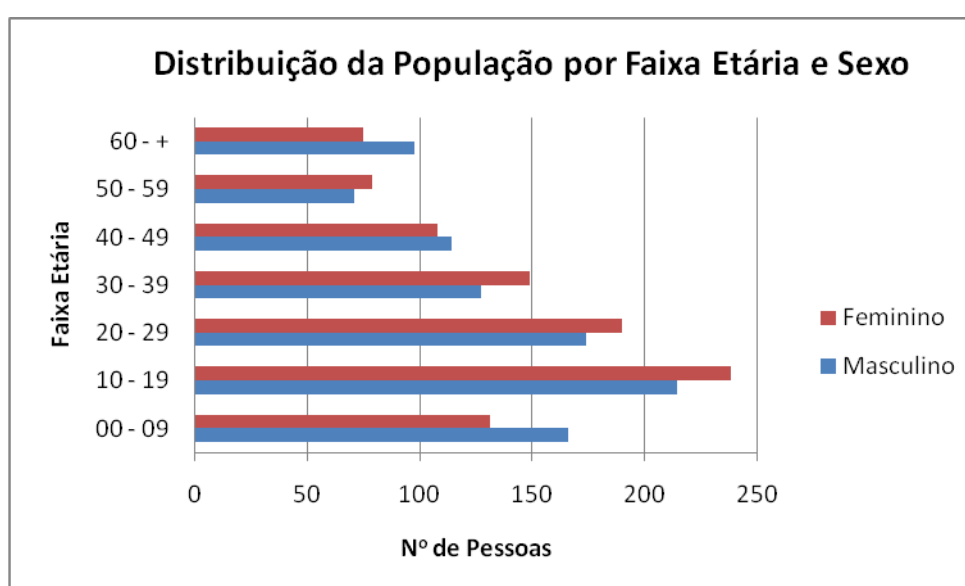
confiança. Possíveis associações entre as variáveis foram pesquisadas através do teste do qui-quadrado, utilizando-se 5% como limite de significância estatística.

4. RESULTADOS

O perfil dos participantes (Tabela 1 e Figura 5) foi de uma população muito homogênea em relação à variável sexo, com valores praticamente idênticos de homens e mulheres. Ocorreu um predomínio de indivíduos situados entre 10 e 29 anos (42,2% do total), decrescendo numericamente a participação de pessoas acima de 50 anos de idade.

Tabela 1. Distribuição dos participantes segundo faixa etária e sexo.

Faixa Etária	Sexo				Total	
	Masculino		Feminino		<i>n</i>	%
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		
0 – 9	163	55,6	130	44,4	293	100,0
10 – 19	205	46,6	235	53,4	440	100,0
20 – 29	170	48,3	182	51,7	352	100,0
30 – 39	126	46,3	146	53,7	272	100,0
40 – 49	109	51,9	101	48,1	210	100,0
50 – 59	68	47,2	76	52,8	144	100,0
60 e +	93	56,4	72	43,6	165	100,0
Total	934	49,8	942	50,2	1.876	100,0



A tabela 2 permite visualizar a ocorrência de 89 indivíduos com teste sorológico positivo para hantavirus, correspondendo a um valor de prevalência de 4,7% (IC_(95%): 3,7 — 5,7). A positividade distribuiu-se de maneira uniforme entre os dois sexos (valores de 4,8% e 4,7%), oscilando entre 3,4% a 5,2% entre as diferentes faixas de idade e não mostrando tendência ascendente a partir dos 10 anos de idade (para o total da tabela: $X^2_{(6gl)} = 1,64$ ($p = 0,950$). Todavia, decompondo-se o grupo de indivíduos mais jovens (até 9 anos) em dois subgrupos (até 5 e de 6 a 9 anos), verifica-se uma visível diferença na presença da infecção (não mostrado na tabela). Entre os 109 participantes até 5 anos de idade ocorreu apenas um positivo (0,9%), enquanto que entre os 184 situados de 6 a 9 anos foram verificadas 9 pessoas com marcadores da infecção . A prevalência neste segundo grupo (4,9%) assemelha-se muito aos valores verificados nos segmentos populacionais mais velhos. Cotejando-se os indivíduos até 5 anos com as demais faixas etárias: $X^2_{(1gl)} = 3,75$ ($p = 0,053$).

Tabela 2. Soropositividade para Hantavirus segundo faixa etária e sexo dos participantes.

Faixa Etária	Sexo								
	Masculino			Feminino			Total		
	Pos.	Total	%	Pos.	Total	%	Pos.	Total	%
0 - 9	8	163	4,9	2	130	1,5	10	293	3,4
10 - 19	10	205	4,9	12	235	5,1	22	440	5,0
20 - 29	11	170	6,5	7	182	3,8	18	352	5,1
30 - 39	3	126	2,4	11	146	7,5	14	272	5,1
40 - 49	5	109	4,6	6	101	5,9	11	210	5,2
50 - 59	6	68	8,8	0	76	0,0	6	144	4,2
60 - +	2	93	2,2	6	72	8,3	8	165	4,8
Total	45	934	4,8	44	942	4,7	89	1.876	4,7

A tabela 3 mostra que, entre os positivos, ocorreu predomínio de indivíduos nascidos em Cássia dos Coqueiros ou em outra cidade do estado de São Paulo. Os percentuais de positividade oscilaram entre 3,8% (nativos do município) a 6,5%, entre os oriundos de outras cidades do Estado $X^2_{(3gl)} = 4,64$: $p = 0,176$).

Tabela 3. Soropositividade para Hantavirus segundo o local de nascimento.

Local de Nascimento	Positivo		Total	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Cássia dos Coqueiros	32	3,8	850	100,0
Ribeirão Preto	11	4,7	233	100,0
Outra cidade do estado de SP	30	6,5	463	100,0
Outro estado	15	4,6	327	100,0
Total	88	4,7	1.873	100,0

Observação: em 3 indivíduos o local de nascimento não foi informado, dos quais 1 mostrou-se positivo para hantavirose

A tabela 4 evidencia uma preponderância numérica de participantes com histórico de sempre terem residido em área rural (1005, ou 53% do total). Os valores de prevalência oscilaram entre um mínimo de 2,3% (residência mista) a 5,7% (exclusivamente urbana). Agrupando-se as categorias “urbana-rural”, “rural-urbana” e “misto”: $X^2_{(2gl)} = 1,08$: $p = 0,581$).

Tabela 4. Soropositividade para Hantavirus segundo histórico de residência.

Residência	Positivo		Total	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Sempre Urbana	22	5,7	384	100
Sempre Rural	46	4,6	1.005	100
Urbana - Rural	1	2,9	35	100
Rural - Urbana	19	4,7	407	100
Misto	1	2,3	45	100
Total	89	4,7	1.876	100

A tabela 5 confirma a preponderância de moradores da área rural (57,7%) no momento da coleta das informações. Os habitantes urbanos mostraram prevalência mais elevada que os rurais (5,3% e 4,3%, respectivamente), com os valores muito próximos entre si no que diz respeito à variável sexo. A análise relativa à área de residência não evidenciou diferença do ponto de vista estatístico ($X^2_{(1gl)} = 0,93$; $p = 0,336$).

Tabela 5. Soropositividade para Hantavirus segundo área de domicílio e sexo.

Área do Domicílio	Sexo								
	Masculino			Feminino			Total		
	Pos.	Total	%	Pos.	Total	%	Pos.	Total	%
Urbana	21	390	5,4	21	403	5,2	42	793	5,3
Rural	24	544	4,4	23	539	4,3	47	1.083	4,3
Total	45	934	4,8	44	942	4,7	89	1.876	4,7

A análise da distribuição da soropositividade para Hantavírus segundo a faixa etária e a área de localização do domicílio (tabela 6) mostrou que presença mais elevada de anticorpos em habitantes urbanos se fez na maioria das faixas etárias consideradas, inclusive nos indivíduos mais jovens (até 9 anos), e, de modo particular, naqueles situados entre 50 e 59 anos.

Tabela 6. Soropositividade para Hantavirus segundo faixa etária e área de localização do domicílio.

Faixa Etária	Área do domicílio								
	Urbana			Rural			Total		
	Pos.	Total	%	Pos.	Total	%	Pos.	Total	%
0 - 9	5	106	4,7	5	187	2,7	10	293	3,4
10 - 19	11	181	6,1	11	259	4,2	22	440	5,0
20 - 29	7	151	4,6	11	201	5,5	18	352	5,1
30 - 39	7	116	6,0	7	156	4,5	14	272	5,1
40 - 49	5	90	5,6	6	120	5,0	11	210	5,2
50 - 59	5	64	7,8	1	80	1,3	6	144	4,2
60 e +	2	85	2,4	6	80	7,5	8	165	4,8
Total	42	793	5,3	47	1083	4,3	89	1.876	4,7

A tabela 7 mostra que a população estudada apresentava uma escolaridade reduzida, com a maioria situando-se em nível primário. Entre os habitantes urbanos, Infecção por hantavirus foi detectada em indivíduos com todos os níveis educacionais. Todavia, entre os moradores de áreas rurais, o mesmo fato foi observado apenas entre os de escolaridade primária e os sem nenhum grau de instrução formal.

Tabela 7. Soropositividade para Hantavírus segundo a escolaridade e zona de domicílio.

Escolaridade	Zona do Domicílio								
	Urbana			Rural			Total		
	Positivo	Total	%	Positivo	Total	%	Positivo	Total	%
Nenhuma	5	59	8,5	4	117	3,4	9	176	5,1
Primário	29	513	5,7	43	809	5,3	72	1322	5,4
Secundário	5	120	4,2	-	58	-	5	178	2,8
Superior	2	52	3,8	-	8	-	2	60	3,3
Não se aplica**	1	49	2,0	-	91	-	1	139	0,7
Total	42	793	5,3	47	1083	4,3	89	1.875*	4,7

* em um indivíduo não foi obtida informação quanto a escolaridade.

** crianças em fase pré-escolar

A positividade para Hantavírus mostrou valores semelhantes entre os indivíduos com diferentes tempos de residência em Cássia dos Coqueiros (tabela 8). ($X^2_{(5gl)} = 3,55$: $p = 0,615$).

Tabela 8. Soropositividade para Hantavirus segundo o tempo de residência em Cássia dos Coqueiros.

Tempo de Residência em Cássia (anos)	Positivo		Total	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
1 - 10	33	5,0	655	100,0
11 - 20	22	4,8	463	100,0
21 - 30	17	6,2	276	100,0
31 - 40	5	2,6	193	100,0
41 - 50	5	4,2	118	100,0
51 - +	7	4,1	171	100,0
Total	89	4,7	1.876	100,0

5. DISCUSSÃO

5.1 Aspectos Gerais de Cássia dos Coqueiros

Cássia dos Coqueiros é um município do estado de São Paulo localizado a uma latitude 21°16'58" sul e a uma longitude 47°10'11" oeste, com uma altitude média de 890 metros. Integrando a região administrativa da cidade de Ribeirão Preto, donde dista 80 quilômetros, Cássia dos Coqueiros tem uma população estimada em 2.871 habitantes (PLANO MUNICIPAL DE SAÚDE, 2010 - 2013) espalhados entre as áreas urbana e rural. A sua atividade econômica é predominantemente ligada à agro-pecuária, que ocupa 65% das terras do Município. À época da coleta das amostras de sangue que originaram este trabalho, havia intensa atividade de produção de sementes para pastagens, de modo especial o cultivo da semente do capim braquiária (*Brachearia decumbens*). Este capim é destinado à plantação e reforma de pastagens e tem grande demanda em diferentes pontos do Brasil. Para emprego na sua produção, a cidade recebia anualmente grandes levas de migrantes temporários, especialmente da região do Vale do Jequitinhonha, que permaneciam por alguns meses no local.

A figura 6 mostra uma vista panorâmica da cidade de Cássia dos Coqueiros.e sua localização no Estado de São Paulo.

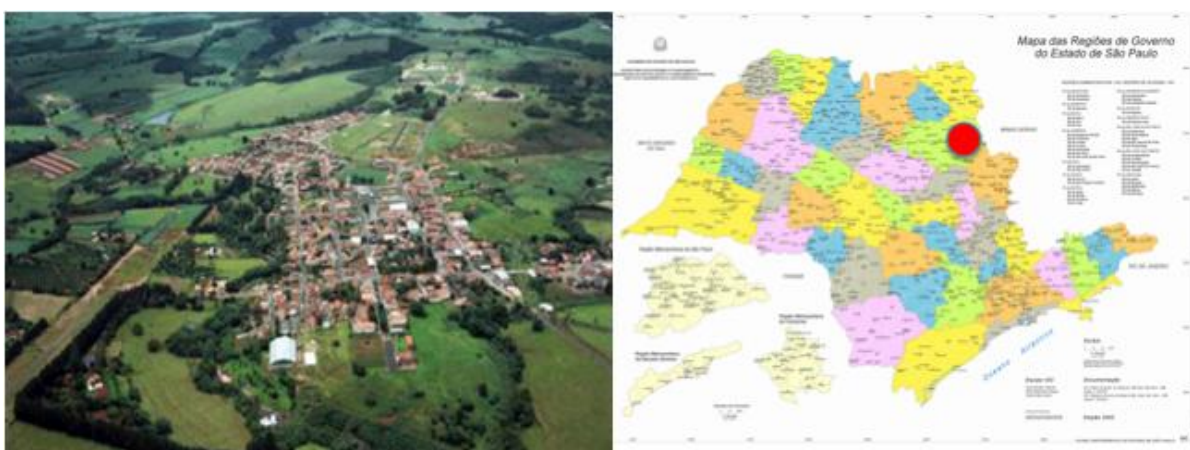


Figura 6. Vista aérea da cidade de Cássia dos Coqueiros e localização do município no Estado de São Pulo (círculo vermelho).

A síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus (SPCVH) é uma doença emergente descrita nos EUA em 1993. Desde então, tem sido detectada também em outros países das Américas, inclusive no Brasil, com mais de mil casos notificados e alta letalidade nos casos detectados (SECRETÁRIA DA VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Devido, em parte, ao fato de ser uma doença descrita muito recentemente, o conhecimento da sua distribuição em populações humanas e o seu real impacto em saúde pública ainda mostram muitas lacunas, necessitando de mais investigações epidemiológicas para o seu completo entendimento. Neste sentido, o conhecimento sobre a possível circulação do vírus em nossa região em época anterior à sua identificação, em 1993, poderia colaborar com o conhecimento sobre esta virose emergente.

A existência de amostras de soro obtidas entre 1986 e 1991, oriunda da população do município de Cássia dos Coqueiros, ofereceu uma oportunidade preciosa para lançar alguma luz sobre esta questão em nosso meio, uma vez que foram coletadas em época anterior ao reconhecimento e descrição da doença americana por Hantavirus. A coleta deste material foi realizada para um estudo transversal sobre a distribuição e fatores de risco para hepatite B em Cássia dos Coqueiros, no qual foram coletadas amostras de sangue de 1951 habitantes com idade superior a um ano de vida, representando praticamente 70% da população total do município. Conforme detalhado na parte referente à Metodologia, esta coleta se fez tanto nas dependências do Centro Médico Social Comunitário Pedreira de Freitas (CMSCPF), pertencente à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como em visitas casa-a-casa, cobrindo todos os domicílios das áreas urbana e rural. Isto somente se fez possível através de intensa mobilização da comunidade e do grande grau de confiança que a população local depositava no CMSCPF, que representa a única unidade de saúde do município. Particularmente decisivo para o êxito da coleta de sangue foi a participação de um antigo funcionário do CMSCPF, conhecedor de todos os habitantes locais, que acompanhava todas as visitas e fazia, ele próprio, a retirada do material. A grande representatividade dos participantes em relação ao total de habitantes confere a este estudo o caráter de pesquisa de base populacional, permitindo, com boa margem de segurança, a generalização dos seus resultados.

Outro fator que estimulou a realização do presente estudo foi representado pela proximidade de Cássia dos Coqueiros e Ribeirão Preto, que facilitou a execução não apenas deste, mas também de estudos prévios sobre hantavirose na área (FIGUEIREDO et al., 1999; HOLMES, 2000; CAMPOS, 2003; SOUSA, 2008).

Como mencionado anteriormente, o município recebia trabalhadores temporários para a cultura da braquiária, os quais permaneciam na área por cerca de quatro a seis meses. Este cultivo associa-se ao aumento da população de roedores, aproximando-os muito dos migrantes, que eram alojados em instalações extremamente precárias do ponto de vista sanitário. Não sem razão, acabaram por se tornar as vítimas mais freqüentes da hantavirose, com quatro trabalhadores indo a óbito pela doença entre 1999 e 2003 (FIGUEIREDO et al., 2005). No período 2005-2007, das 52 amostras provenientes de Cássia dos Coqueiros (CAMPOS, 2007), duas apresentaram IgG positivo para Hantavirus (3,8%). Ambos os pacientes eram do sexo masculino, sendo representados por um estudante e um lavrador, com idades respectivamente iguais a 19 e 51 anos de idade.

Importante salientar que em 2004 observou-se que o Hantavírus implicado com a doença na região de Ribeirão Preto é o ARAV (FIGUEIREDO et al., 2009) e que este agente foi também observado no roedor *Necromys lasiurus* capturado nesta mesma região, suposto reservatório deste vírus (SOUSA et al., 2008). Foi por esta razão que se optou, na presente investigação, pela realização de testes ELISA onde o antígeno utilizado foi o da proteína N recombinante de vírus Araraquara (FIGUEIREDO et al., 2009). A propósito, o teste utilizado neste trabalho apresenta valores de sensibilidade e de especificidade respectivamente iguais a 97,2% e 100% (FIGUEIREDO et al., 2009), o que, aliado ao fato epidemiológico representado pela presença do agente na área de estudo, aponta para a adequação do seu uso e aumenta a confiabilidade dos achados.

Assim, a soropositividade de 4,7% nos 1876 participantes deste estudo demonstra a circulação de Hantavírus em Cássia dos Coqueiros em época anterior à sua identificação no continente americano. Muito embora possível que casos com sintomatologia evidente tenham sido erroneamente diagnosticados como outras entidades clínicas, é provável que uma parcela significativa tenha ocorrido de modo oligossintomático ou até mesmo completamente assintomático. Este fato já havia

sido apontado em estudo realizado com base na análise de prontuários na região de Ribeirão Preto (ROCHA & FIGUEIREDO, 2000).

Após 1993 outros estudos foram realizados demonstrando a presença de infecção humana por Hantavirus no Brasil. Um inquérito sorológico em 1999, na região de Ribeirão Preto, incluindo os municípios de Ribeirão Preto, Guariba e Jardinópolis, encontrou soropositividade de 1,23% (HOLMES et al., 2000). CAMPOS (2003) realizou um inquérito sorológico na população urbana e rural do município de Jardinópolis, tendo verificado 14,3% de soro positividade para Hantavirus ANDV.

Outros inquéritos sorológicos para Hantavírus realizados no Brasil e que mostraram, em todos os casos, presença de indivíduos infectados foram os conduzidos por (MASCARENHAS-BATISTA et al., 1998; NUNES-ARAÚJO et al., 1999; ROMANO-LIEBER et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2003; MENDES et al., 2004).

Pincelli et al, (2003) observaram que a faixa etária com maior soropositividade para Hantavírus era a de adultos jovens, refletindo, talvez, a exposição a roedores durante a atividade laboral. Em Cássia dos Coqueiros, a positividade para hantavirose se fez presente em todas as faixas etárias consideradas, praticamente preservando apenas os indivíduos até os 5 anos de idade. Já a partir deste ponto, os valores de prevalência praticamente não se alteram, mantendo-se ao redor de 5%. Este é um achado interessante e para o qual não se dispõe de uma explicação precisa. Dado que o contato com roedores e seus excretas tende a se fazer em diferentes momentos ao longo da vida, seria de se esperar prevalências crescentes à medida que os indivíduos tornam-se mais velhos.

Em 2000, Young et al. observaram que a infecção dos pacientes com SPCVH se dá, na metade dos casos, perto do local de habitação, 10% no local de trabalho e 5% em sítios relacionados à recreação. Ao contrário do esperado, não se observou diferença significativa entre positividade das infecções por Hantavírus nos indivíduos com residência urbana ou rural. Talvez isso possa ser explicado, ao menos em parte, pelas características de Cássia dos Coqueiros, onde não ocorre uma divisão nítida entre exposições urbanas e rurais, uma vez que existe uma interação muito próxima entre ambas. Isto em decorrência do fato de que muitos habitantes urbanos desempenham suas atividades de trabalho em pequenos sítios e fazendas, para onde se deslocam durante os dias úteis. Assim, poderiam ter contato com roedores

ou com seus excretas em nível semelhante ao verificado por aqueles que habitam permanentemente o meio rural. Além disso, ocorrem visitas constantes dos habitantes urbanos a moradias rurais em finais de semana para atividades de lazer, como a pesca, reproduzindo situações de risco descritas por outros autores (PETERS et al., 2002; YOUNG et al., 2000).

Lamentavelmente, o questionário utilizado para a confecção desta pesquisa não incluiu perguntas sobre contato com roedores, uma vez que foi desenhado para investigar fatores de risco para hepatites virais, situação em que tal variável não apresenta interesse epidemiológico.

Por outro lado, há que se reconhecer que inquéritos sorológicos em populações de risco para contato com roedores mostraram resultados distintos dos esperados, ou seja, baixa positividade para Hantavírus, como em outros grupos de reduzido risco. Exemplo disso é o estudo de Torres-Morales, levado a efeito em Salvador, em 1999, no qual o nível de soropositivos entre os indivíduos de risco (garis) foi menor do que verificado em um grupo controle, representado por doadores de sangue.

O inquérito sorológico preliminar para Hantavírus na região de Ribeirão Preto mostrou positividade de 1,23% sugerindo, já nesta ocasião (1999), não ser rara a infecção por Hantavírus na região (HOLMES 2000). Esta freqüência mostrou-se mais que duas vezes maior do que a observada nos Estados Unidos, em populações com alto risco de infecção por estes vírus (HOLMES 2000). CAMPOS (2003), também realizou inquérito sorológico na região de Ribeirão Preto, encontrando uma soropositividade de 14,3% no município de Jardinópolis. Este valor é significativamente mais elevado do que o referido na grande maioria dos trabalhos epidemiológicos levados a efeito no Brasil e no exterior, ultrapassando em três vezes o observado em Cássia dos Coqueiros. Considerando-se que tanto Jardinópolis como Cássia dos Coqueiros situam-se na região de Ribeirão Preto, apresentando similaridades no que diz respeito a aspectos físicos e padrão de ocupação do solo, esta grande diferença possa talvez ser explicada pela não uniformidade das técnicas e dos antígenos utilizados, uma vez que a proteína N recombinante foi diferente nos dois estudos (vírus Andes no estudo de Jardinópolis e vírus Araraquara em Cássia dos Coqueiros). Outra possível explicação passa por uma eventual degradação de anticorpos no material proveniente de Cássia dos Coqueiros, uma vez que havia

tido obtido cerca de 20 anos antes da realização do presente estudo, tendo permanecido congelado ao longo de todo este tempo. Eventualmente, não pode ser descartada a possibilidade de circulação de diferentes tipos de vírus nas duas cidades apontadas.

Por outro lado, um estudo recente levado a efeito com a finalidade de estudar presença de anticorpos contra Hantavirus em amostras de pacientes febris de Jardinópolis e de Cássia dos Coqueiros revelou positivities para IgG iguais a 4,8% na primeira e 3,8% na segunda, mostrando valores semelhantes entre as cidades e próximos do obtido no estudo atual (FIGUEIREDO GG, 2008).

A presente investigação demonstra a circulação de hantavirus em Cássia dos Coqueiros em época anterior à sua descrição nas Américas, corroborando outros estudos que apontavam para o mesmo achado em áreas diferentes do Brasil (HINDRICHSEN et al., 1993; IVERSSON et al., 1994; NUNES-ARAUJO et al., 1999; HOLMES et al., 2000; ROMANO-LIBER et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2003; MENDES et al., 2004). Muito provavelmente, os casos mais graves foram confundidos com outras doenças com as quais a hantavirose guarda semelhanças do ponto de vista clínico. Por outro lado, este conhecimento aponta também para a existência de um espectro clínico amplo, com um número considerável de infectados apresentando manifestações pouco relevantes, ou até mesmo completamente ausentes.

6. CONCLUSÃO

1. Infecções por Hantavírus já se faziam presentes em Cássia dos Coqueiros ao final da década de 1980 e começo da década de 1990.
2. As infecções por Hantavírus em Cássia dos Coqueiros, entre 1986 a 1991, ocorriam de maneira independente quanto a sexo, escolaridade, tempo de residência, local de nascimento e de residência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, G. C. B.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; ELKHOUURY, M. R.; MARQUES, A. A. R.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C. Soroprevalence for hantavirus in rodents: studies in areas of Brazil Amazon with fatal cases for hantavirus pulmonary syndrome (HPS). *Virus Reviews & Research*, v.8, p. 98-99, 2003.

BAYARD, V.; KITSUTANI, P. T.; BARRIA, E. O.; RUEDAS, L. A.; TINNIN, D. S.; MUNOZ, C. M.; GUERRERO, I. G.; KANT, R.; GARCIA, A.; CACERES, L.; GRACIO, F. G.; QUIROZ, E. C. Z.; ARMIEN, B.; LIBEL, M.; MILLS, J. N.; KHAN, A. S.; NICHOL, S. T.; ROLLIN, P. E.; KSIAZEK, T. G.; PETERS, C. J. Outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Los Santos, Panama, 1999-2000, *Emerg. Infect. Dis.*, 10(9), 1635-1642, 2004.

CAMPOS, G. M. *Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavírus: estudos sobre uma doença emergente*. Tese de doutorado apresentada à área de pós-graduação em Clínica Médica da FMRP-USP. 2007.

CAMPOS, G. M.; SOUSA, R. L. M.; BADRA, S. J.; PANE, C.; GOMES, U. A.; FIGUEIREDO, L. T. M. Serological survey of hantavirus in Jardinópolis county, Brazil. *J. Med. Virol* 71, 417-422, 2003.

CLEMENT JP. HANTAVIRUS. *Antiviral Res.* 57(1-2):121-7. 2003.

DA SILVA, M. V.; VASCONCELOS, M. J.; HIDALGO, N. T.; VEIGA, A. P; CANZIAN, M.; MAROTTO, P. C. Hantavirus pulmonary syndrome. Report of the first three cases in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 39 (4), 231-234, 1997.

FIGUEIREDO *Journal of Travel Medicine and Infectious Diseases. Supl. 1st International Conference.* p.26, 2005.

FIGUEIREDO, G. G. Diagnóstico de Infecções por Hantavirus e Arenavírus em seres Humanos e Roedores. Tese de Mestrado apresentada à Área de pós-graduação em Imunologia Básica da FMRP-USP. 2008.

FIGUEIREDO, L.T. M. et al. Contribuição ao conhecimento sobre a Hantavirose no Brasil. *Informe Epidemiológico do SUS*, 9: 167-178, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M.; serological survey of hantavirus in Jardinópolis county, Brazil. *J. Med. Virol*, 71, 417-422, 2003.

FIGUEIREDO, L. T. M.; MORELI, M. L.; ALMEIDA, V. S. O.; FÉLIX, P .R.; BRUNO, J. C.; FERREIRA, I. B.; MANÇANO, F. D. Hantavirus pulmonary syndrome in Guariba, SP, Brazil. Report of 2 cases. *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo*, 41, 131-137, 1999.

FIGUEIREDO, L. T. M.; MORELI, M. L.; BORGES, A. A.; FIGUEIREDO, G. G.; BADRA, S. J.; BISORDI, I.; SUZUKI, A.; CAPRIA, S.; PADULA, P. Evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Araraquara Hantavirus recombinant nucleoprotein. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, p. 273-6, 2009.

GOLDSMITH, L. H. ELLIOTT, C. J. PETERS AND S. R. ZAKI Ultrastructural characteristics of Sin Nombre virus, causative agent of hantavirus pulmonary syndrome *Journal Archives of Virology*. v.140, Number 12 / December, 1995

HINDRICHSEN, S.; MEDEIROS, A. A.; CLEMENT, J.; LEIRS H.; MCKENNA P., MATTHYS P.; NEILD, G. H. Hantavirus infection in Brazilian patients from Recife with suspected leptospirosis, *Lancet*, 341(8836), 50, 1993.

HOLMES, R.; BOCCANERA R.; FIGUEIREDO L. T.; MANCANO S. R.; PANE, C. Seroprevalence of human hantavirus infection in the Ribeirão Preto region of Sao Paulo State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 6(5), 560-561, 2000.

IVERSSON, L. B.; da ROSA, A. P.; ROSA, M. D.; LOMAR, A. V.; SASAKI, M. G.; LEDUC, J. W. Human infection by Hantavirus in southern and southeastern Brazil. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 40 (2), 85-92, 1994.

JOHNSON, A. M.; BOWEN, M. D.; KSIAZEK, T. G.; WILLIAMS, R. J.; BRYAN, R. T.; MILLS, J. N.; PETERS, C. J.; NICHOL, S. T.. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology*. 238: 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. *J Med Virol* 59: 527-535, 1999.

LEDNICKY, J. A., Hantaviruses. a short review. *Arch. Pathol. Lab Med*; 127(1), 30-35, 2003.

LEDUC, J. W.; SMITH, G. A; PINHEIRO, F. P.; VASCONCELOS, P. F.; ROSA, E. S.; MAIZTEGUI, J. I., 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(4), 810-815, 1985.

LEE, H. W. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. *Rev Infect Dis*;11[Suppl 4]:S864-S876, 1989.

LEE, H. W.; FRENCH, G. R.; LEE, P. W; et al. Observations on natural and laboratory infection of rodents with the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*; 30: 477-482, 1981.

LEE, H. W.; LEE, P. W.; JOHNSON, K. M. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis*; 137:298-308, 1978.

LEE, H.W.; BAEK, L. J.; JOHNSON, K. M. Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 146, n. 5 p. 638-644. nov. 1982.

LEE, H.W. Korean hemorrhagic fever. *Prog Med Virol*; 28:96-113, 1982.

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

LEVIS, S.; MORZUNOV, S. P.; ROWE, J. E.; ENRIA, D.; PINI, N.; CALDERON, G.; SABATTINI, M.; S.T. JEOR, S. C. Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *Journal of Infectious Disease*. 177:529–538, 1998.

LÓPEZ, N.; PADULA, P.; ROSSI, C.; LÁZARO, M. E.; FRANZE-FERNÁNDEZ, M. T. Genetic identification of a new hantavirus causing severe pulmonary syndrome in Argentina. *Virology*. 220: 223-226, 1996.

MARTINEZ, V. P.; BELLOMO, C.; SAN JUAN, J.; PINNA, D.; FORLENZA, R.; ELDER, M.; PADULA, P. J. Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerg Infect Dis*. 11:1848-1853, 2005.

MASCARENHAS-BATISTA AV, DA ROSA ES, KSIAZEK TG, DA ROSA AP, LEDUC JW, PINHEIRO F, TAVARES-NETO J. Anti-Hantavirus antibodies in school children in Salvador, Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998 31(5):433-40. 1998.

MENDES, W. S.; DA SILVA, A. A.; ARAGAO, L. F.; ARAGAO, N. J.; RAPOSO, M. L.; ELKHOURY, M. R.; SUZUKY, A.; FERREIRA, I. B.; DE SOUSA, L. T.; PANNUTI, C. S. Hantavirus infection in Anajatuba, Maranhao, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 10(8):1496-8, 2004.

MENDES, W.S.; ARAGÃO, N.J.L.; SANTOS, H.J.; RAPOSO, L.; VASCONCELOS, P.F.C.; ROSA, E.S.T.; ELKHOURY, M.R. Hantavirus pulmonary syndrome in Anajatuba, Maranhão, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.43, n.4, p.237-240, Jul-Aug.2001.

MENDES, W. S. e colaboradores. *In II Workshop Nacional de Pesquisas Aplicadas em Hantavirus*, Cuiabá-MT, 26-29 Ago2008.

MERTZ, G.J. *Bunyaviridae: bunyaviruses, phleboviruses, nairoviruses, and hantaviruses*. *Clinical Virology*. New York: Churchill Livingstone, 1997.

MONROE, M. C.; MORZUNOV, S. P.; JOHNSON, A. M.; BOWEN, M. D.; ARTSOB, H.; YATES, T.; PETERS, C. J.; ROLLIN, P. E.; KSIAZEK, T. G.; NICHOL, S. T. Genetic diversity and distribution of Peromyscus-borne hantaviruses in North America. *Emerg. Infect. Dis*. 5(1), 75-86, 1999.

MORZUNOV, S. P.; FELDMANN, H.; SPIROPOULOU, C. F.; SEMENOVA, V. A.; ROLLIN, P. E.; KSIAZEK, T. G.; PETERS, C. J.; NICHOL, S. T. A newly recognized virus associated with a fatal case of hantavirus pulmonary syndrome in Louisiana. *J. Virol.* 69:1980–1983, 1995.

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

NICHOL, S.T. Genetic analysis of hantaviruses and their host relationships. In: Saluzzo J.F.; **Dodet,,B.(edes)**. *Emergence and control of rodent-borne viral diseases.* Elsevier, Paris, p.99-109,1999.

NUNES-ARAUJO, F. R.; NISHIOKA, S. D.; FERREIRA, I. B.; SUZUKI, A.; BONITO; R. F.; FERREIRA M. S. Absence of interhuman transmission of hantavirus pulmonary syndrome in Minas Gerais, Brazil: evidence from a serological survey, *Clin. Infect. P.* 1999.

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

PASSOS AD, GOMES UA, FIGUEIREDO JF, DO NASCIMENTO MM, DE OLIVEIRA JM, GASPAM, YOSHIDA CF. Influence of migration on the prevalence of serologic hepatitis B markers in a rural community. 2. Comparative analysis of various characteristics of the population studied. *Rev Saúde Pública.* 1993; 27(1):36-42.

PETERS, C. J.; KHAN, A. S. Hantavirus Pulmonary Syndrome: The New American Hemorrhagic Fever. *Clin Infect Dis*; 34:1224-1231, 2002.

PINCELLI, PIMENTEL M, VALENTE BARBAS CM, RIBEIRO DE CARVALHO CR, MADIA DE SOUZA MC; FIGUEIREDO LTM. Síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus / Hantavirus pulmonary and cardiovascular syndrome. J. pneumol;29(5):309-324, set.-out. 2003

PINI, N. Hantavirus pulmonary syndrome in Latin America, *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 17(5), 427-431, 2004.

PLANO MUNICIPAL DE SAÚDE, 2010-2013 - Governo Municipal de Cássia dos Coqueiros, (Apostila do Governo Municipal).

RABONI, S. M.; PROBST, C. M.; BORDIGNON, J.; ZEFERINO, A.; dos SANTOS, C. N. Hantaviruses in Central South América: phylogenetic analysis of the S segment from HPS cases in Paraná, Brazil. *J. Med. Virol.* 76 (4): 553-562, 2005.

RAMSDEN, C.; MELO, F. L.; FIGUEIREDO, L. T. M.; HOLMES, E. D.; ZANOTTO, P. M. A.; AND VGDN CONSORTIUM. High Rates of Molecular Evolution in *Hantaviruses*. *Mol. Biol. Evol.*, 25 (7), 1488-1492, 2008.

RAVKOV, E. V.; ROLLIN, P. E.; KSIAZEK, T. G.; PETERS, C. J.; NICHOL, S. T. Genetic and serologic analysis of Black Creek Canal virus and its association with human disease and *Sigmodon hispidus* infection. *Virology*. 210:482–489, 1995.

ROCHA, J. S. Y.; FIGUEIREDO L. T. M. A procura de casos de hantavirose. Estudo das hospitalizações na Região de Ribeirão Preto, SP. Resumo publicado em Anais do VI Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva, Salvador, 28 de agosto a 1 de setembro de 2000.

ROMANO-LIEBER, N. S.; YEE, J.; HJELLE, B. Serologic survey for hantavirus infections among wild animals in rural areas of Sao Paulo State, Brazil, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 43(6), 325-327, 2001.

SCHMALJOHN, C. S.; HASTY, S. E.; DALRYMPLE, J. M.; LEDUC, J. W.; LEE, H. W.; VON BONSDORFF, C. H. Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fevers with renal syndrome into a newly defined genus of *Bunyaviridae* family. *Science*, 227, 1041-1044, 1985.

SCHMALJOHN, C. S.; HOOPER, J. W. Bunyaviridae: The viruses and their replication. In: *KNIFE DM, HOWLEY PM (eds.) Fields Virology*, 4th ed, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 1581-1602, 2001.

SCHMALJOHN, C.; B. HJELLE, *Hantaviruses: a global disease problem*, *Emerg. Infect. Dis*; 3(2), 95-104, 1997.

SIMMONS, J. H.; RILEY, L. K. *Hantaviruses: an overview*, *Comp Med.*; 52(2), 97-110, 2002.

SOUSA, R. L. M.; MORELI, M. L.; BORGES, A. A.; CAMPOS, G. M.; LIVONESI, M. C.; FIGUEIREDO, L. T. M.; PINTO, A. A. Natural host relationship and genetic diversity of rodent associated hantaviruses in *Southeastern Brazil*. *Intervirology* 51:299-310, 2008.

SUZUKI, A.; BISORDI, I.; LEVIS, S.; GARCIA, J.; PEREIRA, L. E.; SOUZA, R. P., SUGAHARA, T. K.; PINI, N.; ENRIA, D.; SOUZA, L. T. Identifying rodent hantavirus reservoirs, *Brazil, Emerg. Infect. Dis.*; 10(12): 2127-2134, 2004.

VASCONCELOS, M. I.; LIMA, V. P.; IVERSSON, L. B.; ROSA, M. D.; ROSA, A. P.; da ROSA, E. S.; PEREIRA, L. E.; NASSAR, E.; KATZ, G.; MATIDA, L. H.; ZAPAROLI, M. A.; FERREIRA, J. J.; PETERS, C. J. Hantavirus pulmonary syndrome in the rural area of Jequitiba, São Paulo metropolitan area, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 39(4), 237-238, 1997.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Evidence of circulating hantaviruses in Brazilian Amazonia through high prevalence of antibodies *in residents of Manaus, Brazil*. *Ciência e Cultura*, v. 44 (2/3), p. 162-163, Mar-Jun. 1992.

YANAGIHARA, R.; AMYX, H. L.; GAJDUSEK, D.C. Experimental infection with puumala virus, the etiologic agent of nephropathia epidemica, in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *J Virol*; 55:34-38, 1985.

YOUNG, J. C.; HANSEN, G. R.; GRAVES, T. K.; DEASY, M. P.; HUMPHREYS, J. G.; FRITZ, C. L.; GORHAM, K. L.; KHAN, A. S.; KSIAZEK, T. G.; METZGER, K. B.; PETERS, C. J. The incubation period of Hantavirus Pulmonary Syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62(6), 714–717, 2000.

ZEIER, M.; HANDERMANN, M.; BAHR, U.; RENSCH, B.; MÜLLER, S.; KEHM, R.; MURANY, W.; DARA, G. New Ecological Aspects of Hantavirus Infection: *A Change of A Paradigmand a Challenge of Prevention*. *Virus Genes*, 30 (2), 157-180, Review, 2005.