



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

**SOROPREVALÊNCIA DA HANTAVIROSE EM MILITARES E CIVIS  
NO MUNICÍPIO DE MANAUS**

**RENATO LEMOS PEREIRA**

**MANAUS-AM**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**RENATO LEMOS PEREIRA**

**SOROPREVALÊNCIA DA HANTAVIROSE EM MILITARES E CIVIS  
NO MUNICÍPIO DE MANAUS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Orientador: Dr Pritesh Jaychand Lalwani**

**MANAUS  
2016**



## Ficha Catalográfica

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

P436s      Pereira, Renato Lemos  
Soroprevalência da hantavirose em militares e civis no município  
de Manaus / Renato Lemos Pereira. 2016  
133 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Hantavirose. 2. Soroprevalência. 3. Sentinelas. 4. Militares. 5.  
Amazônia. I. Lalwani, Pritesh Jaychand II. Universidade Federal do  
Amazonas III. Título

**RENATO LEMOS PEREIRA**

**SOROPREVALÊNCIA DA HANTAVIROSE EM MILITARES E CIVIS  
NO MUNICÍPIO DE MANAUS**

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

Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto  
Coordenador PPGCF

Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos professores:

Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani, Presidente  
Fundação Oswaldo Cruz – ILMD

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Paula Gomes Mourão  
Fundação de Medicina Tropical – AM

Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes  
Universidade Federal do Amazonas

Manaus, 01 de dezembro de 2016

*À Patrícia e Fernanda*

## **Agradecimentos**

À minha esposa Patrícia e minha filha Fernanda pelo amor, apoio e paciência pelas várias horas que fiquei ausente para dedicar a este trabalho;

Aos meus Pais e ao meu irmão pelo amor, apoio e incentivo ao longo da vida.

Às instituições de apoio: FAPEAM, Fiocruz-ILMD, UFAM, Exército Brasileiro e Centro de Controle de Zoonoses;

Ao Comandante do Centro de Instrução de Guerra na Selva (CIGS) pela autorização para participar deste projeto e apoio para a sua execução. Em especial, ao Coronel Alcimar Marques de Araújo Martins;

Aos colegas de trabalho do CIGS pelo apoio e dedicação, na minha ausência, para continuidade dos trabalhos que são desenvolvidos pela Divisão de veterinária do Zoológico do CIGS, Em especial Major Palhari, Torres, Thiago Gonçalves, Camila, Sinandra, Mori, Helenice, Cruz, Vilela, Lisboa, Araújo, Joane e a todos os soldados.

Aos colegas da Divisão de saúde do CIGS pelo apoio nas coletas dos militares em especial aos farmacêuticos Tiago e Holanda;

Ao diretor do Centro de Controle de Zoonoses pela autorização das coletas que foram realizadas e pelo apoio;

À equipe das coletas no Centro de Controle de Zoonoses pela dedicação e horas disponibilizadas para tal fim. Em especial à Nadielle, Rose, Lorena e Nataly;

Aos voluntários participantes do projeto por autorizarem a coleta de sangue e a disponibilidade do tempo para responder nossos longos questionários, muito obrigado;

À toda equipe da Biotecnologia- UFAM pelo imenso apoio nesse projeto. Principalmente aos Dr Spartaco e Dr Carlos Gustavo pelo apoio institucional. À Dr<sup>a</sup> Enedina pelas várias horas disponíveis ensinando técnicas e apoiando para finalização do trabalho. À Anita pelo apoio na extração e purificação da proteína.

Aos colegas do IDI (Infectious Diseases and immunology) pelo apoio nesse imenso projeto, pela amizade e pelas muitas horas agradáveis e difíceis que tivemos nesse período de trabalho. Rafaella, Bárbara, Nadielle, Maria, Juliana, Fábio, Tiago, Amanda, Fernanda, Rodrigo, Marcos, Marissa e Marjorie

Ao Professor Dr Boechat e seus alunos, Adriane e Aguyda, pelo apoio e convívio.

Às Professoras Dr<sup>a</sup> Cristina, Dr<sup>a</sup> Aya e Dr<sup>a</sup> Jaila o imenso apoio disponibilizando materiais e conhecimento para o projeto.

Ao João Bosco Lima Gimaque pelo apoio em diversas fases do projeto;

À Bárbara pela amizade e pelas muitas horas de convívio e trabalho que tivemos para finalizarmos esse grande projeto;

E ao Professor Dr Pritesh pela amizade, pela imensa dedicação que tem aos seus alunos e pelos ensinamentos durante essa jornada. Meus sinceros agradecimentos.



*Uma das grandes descobertas dos tempos modernos – A hipótese, que substituiu a ideia do dogma ou da doutrina. Podemos formar uma hipótese e estar perfeitamente preparados para alterá-la quando aparecem novos fatos; não precisamos nos prender a ela a qualquer preço, e martirizar outras pessoas por causa delas. Por isso, espero poder sempre aceitar que talvez eu esteja errado.*

*Aldous Huxley*

## RESUMO

A Hantavirose é uma zoonose emergente causada por de 24 espécies de vírus pertencentes ao gênero hantavírus. É transmitida por contato direto com roedores infectados ou pela inalação de aerossóis provenientes de excretas e secreções por eles eliminadas. No mundo, a doença apresenta duas formas clínicas: Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR), prevalente na Europa e Ásia (Velho Mundo) e Síndrome Cardiopulmonar (SCH), prevalente nas Américas (Novo Mundo). Na segunda forma, a mortalidade varia entre 33 e 100 %. Não existe tratamento disponível para a doença. No Brasil, diversos casos foram registrados, principalmente na região Sudeste, com dados epidemiológicos definidos. Na Amazônia, há poucos registros de casos e poucas pesquisas a respeito da prevalência e dos fatores epidemiológicos envolvidos na transmissão da doença. Além disso, determinadas atividades humanas podem facilitar a exposição ao vírus. A atividade militar pode ser considerada como atividade de risco para o contato com o vírus, podendo este grupo funcionar como sentinela para a sua presença no ambiente. O presente estudo visa avaliar a soroprevalência da hantavirose em militares e civis no município de Manaus. Para atingir este objetivo, foram desenvolvidos um teste ELISA e um teste *Dot Blot*, ambos para a pesquisa de anticorpos IgG contra o hantavírus. Foram coletadas 1073 amostras (entre 01/2014 - 03/2016) e aplicados questionários sociodemográficos e epidemiológicos aos participantes do inquérito sorológico. Foi desenvolvido, também um antígeno para os testes sorológicos propostos. Uma proteína recombinante consenso do nucleocapsídeo do vírus foi construída a partir das sequências da proteína N dos genótipos de Hantavirus ANDV, CASV e RIOMV, que ocorrem na região Amazônica, a partir de dados do *GenBank*. A partir desta sequência proteica construída, foi sintetizado um segmento S do hantavírus. A expressão proteica deu-se em bactéria *E. Coli* BL21 (DE3) e a proteína resultante foi purificada por cromatografia de afinidade. A sequência da porção do segmento S sintetizada do Hantavírus foi confirmada através de sequenciamento e analisada filogeneticamente, confirmando a semelhança com as espécies de hantavírus que ocorrem na região amazônica. Amostras de soro foram testadas pelo teste ELISA e as amostras positivas foram confirmadas com teste *Dot Blot*. No estudo epidemiológico, foram analisadas 1073 amostras de sangue (n=547 civis, n=526 militares). Foi observada prevalência de 7,46% na população estudada (n=1073). A prevalência entre os grupos estudados foi de 7,86 e 7,03 para civis e militares, respectivamente. Na análise dos questionários, os militares apresentaram como fator de risco ser mordido por roedores e os civis, matar ou capturar roedores, ambos fatores ligados ao contato direto com roedores. Conclui-se que a soroprevalência da Hantavirose no estado do Amazonas é alta, comparado aos resultados anteriores de soroprevalência publicados. Apesar da prevalência do grupo militar estudado ser menor que a da população geral analisada, a prevalência também é alta comparada aos resultados anteriores de soroprevalência publicados. A característica da atividade aumenta a possibilidade de exposição destes indivíduos ao vírus, destacando as atividades desenvolvidas em áreas de selva. Entre os civis, surge o alerta para a alta prevalência da doença em uma população urbana, na cidade mais populosa da região centro amazonense.

**Palavras-chave:** Soroprevalência, hantavírus, sentinelas, militares, animais, Amazônia.

## ABSTRACT

The Hantavirus is an emerging zoonotic disease caused by 24 species of viruses belonging to the genus hantavirus. It is transmitted by direct contact with infected rodents or by inhalation of aerosols from excreta and secretions by them eliminated. Worldwide, the disease has two clinical forms: Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), prevalent in Europe and Asia (Old World) and Cardiopulmonary Syndrome (SCH), prevalent in the Americas (New World). In the second form, the mortality rate ranges between 33 and 100%. There is no treatment available for this disease. In Brazil, several cases have been recorded, mainly in the Southeast, with defined epidemiological data. In the Amazon, the few records, little is known about the prevalence and epidemiological factors involved in transmission. Furthermore, some human activities can facilitate exposure to the virus, for example, military activity, which can be considered as risk activity for contact with the virus. This group can function as a sentinel to its presence in the environment. This study aims to evaluate the seroprevalence of hantavirus in Military and civilians in the central region of Amazonas. To achieve this goal, we were used to search against hantavirus IgG ELISA test and a test Dotblotting. 1073 samples were collected (from 01 / 2014- 03/2016) and questionnaires sociodemographic and epidemiological to participants of the survey. Also, there was developed an antigen for serological tests proposed. A recombinant protein of the nucleocapsid of the virus from a consensus sequence of the protein ANDV N, ASC and RIOMV that occurring in the Amazon, was built using data available in GenBank. Expression was in *E. Coli* BL21 (DE3) and the resulting protein was purified by affinity chromatography. The sequence of the Hantavirus segment portion S synthesized was confirmed by sequencing and analyzed phylogenetically, confirming the similarity to the species of hantavirus that occur in the Amazon region. Serum samples were tested by this ELISA developed and positive samples were confirmed by *Dot Blot* using the same protein. In the epidemiological study were analyzed 1073 blood samples (n = 547 Civil, n = 526 Military). the prevalence of 7.46% was observed in the study population (n = 1073). The prevalence between the groups was 7.86 and 7.03 for civilians (n°= 547) and military (n°= 526), respectively. In the analysis of the questionnaires, the military presented as a risk factor being bitten by rodents and Civil, kill or capture rodents. Both factors linked to direct contact with the reservoir. We conclude that the prevalence of Hantavirus in the state of Amazonas is high compared to previous results of published seroprevalence. Despite the prevalence of the military group is lower than the general population, the characteristic of activity increases the possibility of exposure of these individuals to the virus, highlighting the activities in wilderness areas. Among Civil, alert to the high prevalence of the disease occurs in an urban population, the most populous city in central Amazonian region.

Keywords: seroprevalence, hantavirus, sentinel, civilians, military, Amazon.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo de transmissão do Hantavírus.....	26
Figura 2. Bioma amazônico e os genótipos registrados .....	33
Figura 3. Ciclo de transmissão do Hantavírus: grupos sentinelas para a doença.....	41
Figura 4. Plasmídeo pBSKN_AM_Hanta sintetizado .....	50
Figura 5. O plasmídeo pGS 21a modificado .....	50
Figura 6. Sequência das ações para extração da proteína não solúvel da hospedeira. ....	57
Figura 7. Disposição da placa de 96 poços para ELISA .....	62
Figura 8. Fórmula para o cálculo do Cut-off.....	63
Figura 9. Esquema das diferentes concentrações da proteína no papel de nitrocelulose. ....	63
Figura 10. Tipos de respostas do teste de <i>Dot Blot</i> para detecção de soros positivos para IgG contra a Proteína N_AM_Hanta. ....	64
Figura 11. Fluxograma dos resultados.....	66
Figura 12. Árvore filogenética com as principais espécies que ocorrem na América do Sul e representantes das Américas, Europa e Ásia.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Figura 13. Análise comparativa entre a sequência de aminoácidos consenso da proteína N e as sequências de aminoácidos das cepas utilizadas para a formação da sequência consenso.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Figura 14. A) Liberação do inserto N_AM_Hanta (~1370 bp), utilizando as enzimas de restrição NdeI e NotI ; B) Inserto com a sequência consenso codificadora da proteína N do Hantavírus (1370 pb) após digestão, extração e purificação. ....	67
Figura 15. A) Produto da ligação do plasmídeo pGS modificado com a sequência consenso; B)	

confirmação de que o processo de ligação foi correto.....	
Figura 16. Desenho do plasmídeo pGSN_AM_Hanta após sistema de ligação.....	66
Figura 17. Gel de poliacrilamida - expressão da proteína .....	69
Figura 18. Fases de expressão e de extração.....	70
Figura 19. Curva de absorvância na fase de purificação com separação das substâncias presentes no produto da extração por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.....	72
Figura 20. Western Blot utilizando a proteína N_AM_Hanta como antígeno.....	73
Figura 21. <i>Dot Blot</i> utilizando a proteína N_AM_Hanta do hantavírus.....	74
Figura 22. <i>Dot Blot</i> utilizando várias concentrações da Proteína N_AM_Hanta.....	75
Figura 23. Gráficos da prevalência de toda a população e dos grupos analisados.....	77
Figura 24. Local de residência dos participantes que foram positivos nos imunoenaios; .....	80
Figura 25. Fator "matar ou capturar roedores" associado a positividade no teste sorológico ..	81
Figura 26. Militares: local onde residiam.....	83
Figura 27. Fator de risco dos militares.....	87
Figura 28. Mapa da distribuição das amostras positivas no grupo civil nas regiões administrativas da cidade de Manaus, com as respectivas prevalências.....	88
Figura 29. Gráfico demonstrando a análise comparativa das faixas etárias entre os positivos dos grupos Militar e Civil.....	92
Figura 30. Faixa de renda .....	92
Figura 31 Razão da absorvância pelo Cut-Off (Abs/Cut-Off) dos resultados do teste ELISA e os dados dos testes de <i>Dot Blot</i> . a consideradas indeterminadas. <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
Figura 32. Desenho da placa para o teste de ELISA. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais reservatórios e genótipos de Hantavírus identificados na região amazônica. ....	31
Tabela 2. Registro de casos confirmados no Sistema de informação de agravos notificados..	34
Tabela 3. Estruturas adicionadas à sequência consenso. ....	49
Tabela 4. Linhagens bacterianas utilizadas no estudo. ....	49
Tabela 5. Plasmídeos utilizados no estudo .....	50
Tabela 6. Distribuição dos participantes pelos municípios de origem. ....	79
Tabela 7. Dados epidemiológicos da população estudada. ....	81
Tabela 8. Características dos militares estudados .....	82
Tabela 9. Número de participantes que residiam em Manaus ou que eram de outras cidades.	83
Tabela 10. Dados sociodemográficos dos militares .....	86
Tabela 11. Dados epidemiológicos para militares. ....	86
Tabela 12. Distribuição dos Civis positivos e negativos na cidade de Manaus por zonas. ....	88
Tabela 13. Dados sociodemográficos dos civis. ....	91
Tabela 14. Dados epidemiológicos para civis. ....	92
Tabela 15. Dados sociodemográficos dos positivos. ....	94
Tabela 16. Dados epidemiológicos entre positivos e negativos. ....	94
Tabela 17. 1) Tampões utilizados nas fases de extração e purificação; 2) tampões da diálise para redução da concentração da uréia, reduzindo das condições desnaturantes da proteína recombinante. ....	126
Tabela 18. Componentes da reação de digestão analítica realizada em dois microtubos, um para cada plasmídeo. ....	128

Tabela 19. Componentes da reação de digestão de maior volume realizada em dois microtubos, um para cada plasmídeo .....	128
Tabela 20. Sistema de ligação .....	128



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2. DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>24</b>
2.1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
2.1.1. Agente etiológico.....	24
2.1.2. Hospedeiros .....	28
2.1.3. Epidemiologia.....	31
2.1.4. Fatores de transmissão.....	35
2.1.5 Sentinelas.....	39
2.2. OBJETIVOS .....	44
2.3 METODOLOGIA.....	45
2.3.1 Delineamento e população do estudo .....	45
2.3.2 Produção, extração e purificação da proteína N_AM_Hanta.....	47
2.3.3 Imunoensaio (ELISA) para detecção de anticorpos IgG .....	60
2.3.4. Teste confirmatório utilizando a técnica de <i>Dot Blot</i> .....	63
<b>3. APRESENTAÇÃO, ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>66</b>
3.1. RESULTADOS .....	66
3.1.1. Análise filogenética da sequência consenso construída	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1.3 Ligação dos fragmentos de interesse.....	66
3.1.4. Expressão do pGSN_AM_Hanta em E. Coli BL21(DE3) .....	69

3.1.5 Determinação da solubilidade da proteína N.....	70
3.1.6. Purificação da fração insolúvel da Proteína N_AM_Hanta em condições desnaturalastes.....	70
3.1.7. Teste da imunogenicidade e antigenicidade da proteína utilizando Western blot..	72
3.1.8. Ensaio da proteína utilizando <i>Dot Blot</i> .....	74
3.1.9. Resultado do teste enzimático (ELISA) para IgG e do <i>Dot Blot</i> contra a proteína N_AM_Hanta. ....	75
3.1.10. Resultado das análises estatísticas.....	76
3.2. DISCUSSÃO .....	95
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>104</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>105</b>
<b>APÊNDICE A –Resultados.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>APÊNDICE B – Dados sociodemográficos da População geral.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>APÊNDICE C – Dados sociodemográficos da População geral.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>APÊNDICE D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....</b>	<b>113</b>
<b>APÊNDICE E- Questionário aplicado aos proprietários de animais- CCZ .....</b>	<b>115</b>
<b>APÊNDICE F – Questionário aplicado aos militares.....</b>	<b>121</b>
<b>APÊNDICE G – Preparação de células eletrocompetentes.....</b>	<b>125</b>
<b>APÊNDICE H – TAMPÕES .....</b>	<b>126</b>
<b>APENDICE I – SOLUÇÕES.....</b>	<b>127</b>
<b>APENDICE J – REAÇÕES.....</b>	<b>128</b>
<b>APÊNDICE L – Protocolo para o teste ELISA utilizando a Proteína recombinante N_AM_Hanta .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A Hantavirose é uma zoonose emergente com ampla distribuição pelo mundo, tendo roedores como principais reservatórios e transmissores. O vírus pertence à família Bunyaviridae. Os vírions desta família são grandes, envelopados e possuem como genoma três fragmentos de RNA de polaridade negativa (JONSSON *et al*, 2010). Diferentes espécies de hantavírus já foram descobertas em pequenos mamíferos, sendo 24 espécies causadoras de patologia no homem (DEARING & DIZNEY, 2010; ICTV). No homem, a transmissão ocorre, principalmente, por inalação de aerossóis provenientes de excretas e secreções eliminadas por roedores infectados. A doença pode se manifestar como a Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR), que ocorre na Europa e Ásia, e a como Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus, que ocorre nas Américas. Nas duas síndromes clínicas ocorre extravasamento de líquido dos vasos para o interstício levando à alteração renal e pulmonar, podendo causar choque (FIGUEIREDO *et al.*, 2014). Apesar dos avanços na pesquisa, não foram aprovados antivirais, vacinas e imunoterápicos para o tratamento da doença (JONSSON *et al*, 2010).

Países como Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Peru, e Venezuela, que possuem o bioma Amazônico em seu território, têm registrado casos de hantavirose, demonstrando a circulação do vírus nesses locais (ALVES MORAIS *et al.*, 2016; DE THOISY *et al.*, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2014; FIRTH *et al.*, 2012; HJELLE; TORRES-PÉREZ, 2010; MATHEUS *et al.*, 2006; MONTGOMERY *et al.*, 2012; MONTOYA-RUIZ; DIAZ; RODAS, 2014). O Brasil tem registro de casos em todas as regiões. No entanto, a região Norte, também coberta pelo bioma Amazônico, possui poucos registros, com casos nos

estados do Amazonas, Maranhão, Mato Grosso e Pará (FIGUEIREDO *et al*, 2014; PINTO JUNIOR *et al*, 2014). Desde o primeiro registro em 1995 até 2016, esses números têm aumentado (BRASIL, 2016a).

A região amazônica é endêmica para doenças com manifestações clínicas semelhantes à hantavirose e de difícil diagnóstico diferencial, como Leptospirose, Influenza, doenças hemorrágicas (Dengue e Febre Amarela), pneumonias atípicas e febres atípicas. A compreensão da epidemiologia da hantavirose é relevante para o atendimento de pessoas infectadas pelo vírus e com manifestações graves, e para o estabelecimento de ações de prevenção (FIGUEIREDO, 2006; PINTO JUNIOR *et al*, 2014).

No Amazonas, a primeira referência da circulação do vírus ocorreu em um inquérito sorológico em 1991 (VASCONCELOS *et al*, 1992). Até a presente data, apenas 6 casos da doença foram registrados no Sistema Nacional de Vigilância do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016a). No entanto, existem mais 4 registros na literatura, totalizando 10, que sugerem a subnotificação de casos. Dos 10 casos, 4 ocorreram no município de Itacoatiara no ano 2004 (DOS SANTOS *et al.*, 2006); 1 ocorreu no Município de Maués em 2005 (TEIXEIRA *et al.*, 2006; GIMAQUE *et al.*, 2012); 1 ocorreu no ano de 2008, sem dados do município; 2 ocorreram em 2009, sem dados dos municípios (FIRTH *et al.*, 2012); e 2 ocorreram no município de Careiro da Várzea, em 2011 (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; MS/SVS, 2015). Foram identificados dois vírus: Castelo dos Sonhos (CASV), nos casos diagnosticados em 2009; e o Rio Mamoré (RIOMV), nos casos diagnosticados em 2011 (FIRTH *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014). GIMAQUE *et al* (2012) realizaram o primeiro levantamento sorológico em humanos, em quatro municípios do estado do Amazonas (Itacoatiara, Lábrea, Careiro Castanho e Atalaia do Norte) obtendo resultados de soroprevalência de 0,2%, 0,9%, 0,4% e 0,8%, respectivamente. Estes dados demonstram a

presença e a circulação do vírus no estado do Amazonas. No entanto, mais dados são necessários para determinar a real prevalência da hantavirose no estado.

Ferramentas de vigilância epidemiológicas são importantes para o acompanhamento da disseminação de doenças e o para mapeamento das áreas de ocorrência. Alguns métodos são utilizados para o mapeamento das áreas de ocorrência do hantavírus: Registro e notificação de casos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2006; ELKHOURY *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2006); Captura de reservatórios roedores (FIGUEIREDO *et al.*, 2010; LARRIEU *et al.*, 2003; MILLS *et al.*, 1999; NISBETT *et al.*, 2001) e soroprevalência de anticorpos contra o vírus na população (GIMAQUE *et al.*, 2012; MONTGOMERY *et al.*, 2012 BADRA, 2010). Animais (domésticos e selvagens) e alguns grupos de pessoas que desenvolvem atividades de risco para a contaminação pelo vírus podem funcionar como grupos sentinelas, sinalizando a circulação do vírus em determinadas regiões. A soroprevalência do hantavírus nesses grupos sentinelas pode funcionar como uma ferramenta útil no controle e mapeamento da circulação do hantavírus (SCOTCH *et al.*, 2009; JONSSON *et al.* 2010) .

Em humanos, determinadas profissões podem expor indivíduos ao vírus e serem considerados grupos de risco para contaminação (PINTO JUNIOR *et al.*, 2014; JONSSON *et al.*, 2010; DEARING & DIZNEY, 2010). Militares são considerados vulneráveis à transmissão do vírus. Esses profissionais podem ser expostos em atividades de treinamento ou em situações de conflito em áreas endêmicas para o Hantavírus (BRASIL, 2014; DEARING; DIZNEY, 2010; NEWMAN *et al.*, 2014; CLEMENT *et al.*, 1996;). Na Amazônia, militares do Exército Brasileiro atuam dentro da Selva Amazônica e em contato com as ameaças que esse bioma pode oferecer. Esse grupo pode ser monitorado funcionando como sentinela para a Hantavirose na região Norte.

No presente estudo, será realizada a soroprevalência da Hantavirose em militares e civis no município de Manaus. Busca-se, dessa forma, mais dados sobre a prevalência da Hantavirose no Amazonas, principalmente na região mais habitada do estado.

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 2.1.1. Agente etiológico

O gênero Hantavírus pertence à família *Bunyaviridae*. Este gênero possui um grande número de espécies distribuídas pelo mundo, tendo pequenos mamíferos como hospedeiros, como roedores e outros mamíferos insetívoros (JONSSON *et al*, 2010). É um vírus RNA, envelopado, que apresenta aproximadamente 12.000 nucleotídeos, divididos em três fragmentos de polaridade negativa. O tamanho do vírus varia de 80 a 120 nm. Os três segmentos do genoma são divididos conforme o tamanho e codificam as seguintes proteínas: segmento S (Small) que codifica a proteína do nucleocapsídeo (N); segmento M (Medium) que codifica as glicoproteínas do envelope (Gn e Gc); e segmento L (Large) que codifica a proteína RNA-polimerase dependente do RNA (RpRd). Cada segmento de RNA (S, M e L) é envolvido pela proteína N formando moléculas circulares de nucleocapsídeo (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; YOSHIMATSU & ARIKAWA, 2014; FIGUEIREDO *et al* , 2008).

Muito Sorotipos já foram identificados representando mais de 80 formas genéticas (OLIVEIRA *et al.*, 2014). No entanto, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) reconhece 24 espécies e estabelece critérios para classificação de novos vírus dentro do gênero Hantavírus (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Apesar da divisão, os vírus deste gênero apresentam alta similaridade na organização da sequência dos segmentos de RNA e ciclos de vida semelhantes (JONSSON *et al*; 2010). A nomenclatura dos



vírus adotada, geralmente, tem sido o nome da região onde o vírus foi identificado pela primeira vez (PINTO JUNIOR *et al*, 2014).

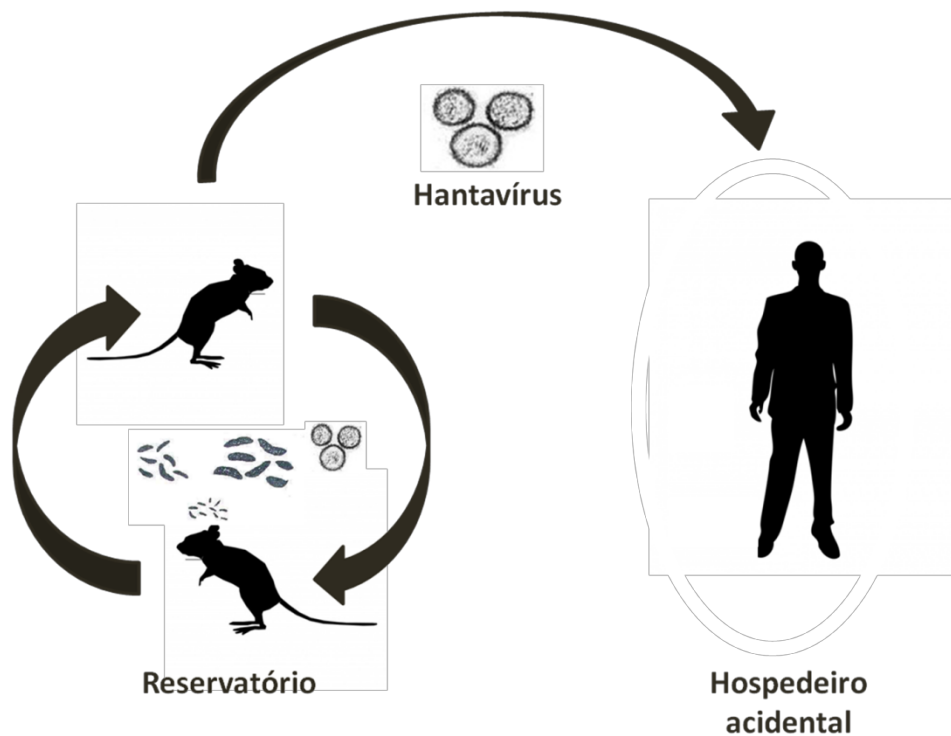
O vírus também é classificado conforme a distribuição geográfica dos reservatórios roedores, Velho Mundo e Novo Mundo, e o tipo de manifestação clínica observada em humanos, Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) e Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (SCH). Alguns autores propõe a unificação das síndromes clínicas, com a denominação de Doença por Hantavírus, pois acreditam que a divisão é meramente didática (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; CLEMENT *et al*, 2012;).

### ***Transmissão***

A relação do Hantavírus com o seu reservatório natural tem um papel importante na transmissão (KHAIBOULLINA *et al*, 2005). A distribuição, a história natural e o comportamento dos reservatórios determinam as áreas de transmissão do vírus e a distribuição geográfica dos casos de Hantavirose (FIRTH *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2014; JONSSON *et al*, 2010).

O ciclo de transmissão do vírus entre os reservatórios roedores, principais transmissores, ocorre pela transmissão horizontal. A relação social e a flutuação do tamanho de uma população auxiliam na disseminação do vírus. O contato com fluídos corporais e aerossóis são as principais formas de transmissão que ocorrem em combates (mordidas e agressões), em disputas territoriais e reprodutivas, ou pela convivência social, como o comportamento de limpeza entre membros de um grupo (OLIVEIRA *et al.*, 2014; MILLS *et al.*, 1999).

A transmissão do vírus para humanos ocorre através do contato direto com hospedeiros infectados ou pela inalação de aerossóis dos dejetos e líquidos corporais (saliva, sangue e fezes). O contato ocorre pela sobreposição da área de vida do reservatório com a dos humanos, tanto pela invasão do homem em áreas preservadas como pela atração de roedores para próximo das residências (ARAUJO *et al.*, 2012) (Figura 1).



**Figura 1. Ciclo de transmissão do Hantavírus: Ciclo de transmissão horizontal do reservatório pelo contato com aerossóis de dejetos e fluidos corporais de roedores infectados; O homem é o hospedeiro acidental do ciclo de transmissão horizontal, e se infecta pelo contato com aerossóis de dejetos e fluidos corporais de roedores infectados, podendo desenvolver a FHSR ou SCH.**

### ***Replicação***

O Hantavírus infecta células através da ligação das proteínas virais G1/G2 com receptores de superfície presente nas células do hospedeiro. Esse processo ocorre

principalmente nas células endoteliais, epiteliais, dendríticas foliculares, além de macrófagos e linfócitos. As integrinas  $\beta 1$  são utilizadas por hantavírus considerados apatogênicos. As integrinas  $\beta 3$  são as responsáveis pela ligação entre células e vírus patogênicos, mais especificamente a  $\alpha v\beta 3$  integrina, presente em células epiteliais e plaquetas (JONSSON *et al.*, 2010). Os receptores do complemento CR3, formado pela associação das integrinas  $\beta 2$  e  $\alpha M$ , e CR4, formado pela associação das integrinas  $\beta 2$  e  $\alpha X$ , são outros receptores de entrada utilizados pelo Hantavírus que estão ativados na infecção (RAFTERY *et al.*, 2014).

Outras estruturas que não são integrinas interagem com o Hantavírus como co-fatores da infecção, como a DAF (Fator de declínio da aceleração) (KRAUTKRÄMER; ZEIER, 2008), uma glicofosfatidilinositol (GPI) ancorada a proteína do sistema regulatório do complemento e o receptor do domínio da cabeça globular do complemento (gC1qR) (CHOI *et al.*, 2008).

Após a ligação, ocorre a endocitose do vírus, via clatrina, e a liberação do material nucleico para dentro do citosol na fusão do envelope com o endossomo. A RpRd auxilia a transcrição do mRNA dos segmentos S, M e L. A tradução do mRNA em proteínas virais ocorre em estruturas do maquinário celular. Os mRNA dos segmentos S e L são traduzidos nos ribossomos livres no citoplasma e o mRNA do segmento M é traduzido nos ribossomos ligados à membrana do retículo endoplasmático rugoso. Após a tradução das proteínas virais, a polimerase viral troca o processo de transcrição pelo processo de replicação dos genomas virais, que junto das proteínas já produzidas, vão compor os novos virions. A proteína N é produzida em grande quantidade logo no início da infecção e tem um papel importante no ciclo de vida viral. Esta proteína interage e modula a resposta do sistema imunológico. A proteína N formará um envoltório nos segmentos dos RNA replicados. Finalizando o processo com a montagem e liberação dos novos virions pelas células. (JONSSON *et al.*, 2010; YOSHIMATSU & ARIKAWA, 2014a, 2014b; ZEIER *et al.*, 2005).

No processo de replicação viral, mutações podem ocorrer permitindo a adaptação do vírus a novos hospedeiros e podendo tornar o vírus um patógeno emergente. A RdRp pode realizar trocas pontuais nos nucleotídeos no momento da tradução podendo gerar mutantes. Em infecções com duas ou mais espécies de Hantavírus pode ocorrer o ressortimento, podendo gerar novos rearranjos dos segmentos virais (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2014).

### ***Patogenia***

A patogenia da hantavirose está associada com a presença do vírus e a atividade imunológica que altera a permeabilidade das células endoteliais dos vasos. Ocorre ativação de efetores imunológicos e atração de células inflamatórias. Na SRH, o homem desenvolve edema pulmonar, deficiência respiratória, hipotensão e choque cardiogênico. Na FHSR, o vírus infecta células e atrai células inflamatórias que causam dano tubular (JONSSON; *et al* 2010; KHAIBOULLINA; MORZUNOV; ST JEOR, 2005).

#### **2.1.2. Hospedeiros**

Desde a descoberta do agente viral causador do Hantavírus e da identificação do reservatório roedor na década de 70, diversas espécies de vírus e de reservatórios roedores foram identificadas pelo mundo. Os principais hospedeiros e transmissores da doença são da ordem Rodentia. No entanto, outras ordens foram identificadas albergando o vírus como a Chiroptera (morcegos) e a Soricomorpha (mussaranhos e toupeiras) (DE ARAUJO *et al.*,

2012; GUO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2014; WITKOWSKI *et al.*, 2014); .

A ordem Rodentia possui aproximadamente 2200 espécies identificadas no mundo, o que representa 42% das espécies de mamíferos existentes. Está presente em diversos biomas do planeta, em razão da sua grande capacidade de adaptação ecológica e fisiológica a ambientes. (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Apesar da grande variedade, as espécies de roedores identificadas como transmissoras do Hantavírus pertencem às famílias Cricetidae (Subfamílias Arvicolinae, Neotominae e Sigmodontinae) e Muridae (subfamília Murinae) e estão distribuídas da seguinte forma pelo mundo (SOUZA *et al.*, 2014):

**1) Família Cricetidae:**

- Subfamília Arvicolinae: Encontrada na Europa, Ásia e América do Norte;
- Subfamília Neotominae e Sigmodontinae: Encontradas no continente Americano (Novo Mundo).

**2) Família Muridae:**

- Subfamília Murinae: Encontrada na Europa e Ásia (Velho Mundo) e mais recentemente na África;

As espécies responsáveis pela transmissão da doença na América do Sul pertencem à subfamília Sigmodontinae. No Brasil, os gêneros desta subfamília identificados como reservatórios são Akodon, Calomys, Holochilus, Necromys e Oligoryzomys. (ROSA *et al.*, 2005; JONSSON *et al.*, 2010; FIRTH *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.* 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014; MONTOYA-RUIZ *et al.*, 2014;).

As espécies da subfamília Sigmodontinae são silvestres e são encontradas em todos os biomas existentes no Brasil (Amazônico, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Pampas e

Caatinga) (OLIVEIRA *et al.*, 2014). As espécies *Necromys Lasiurus* e *Oligorysomys nigripes* são os principais reservatórios do vírus nos biomas Cerrado e Mata Atlântica. No entanto, seu potencial de transmissão se estende por todo o país, exceto na área do Bioma Amazônico. Este Bioma, que ocupa uma área bastante extensa, possui poucos dados sobre os reservatórios do Hantavírus. A Amazônia ultrapassa as fronteiras de vários países na América do Sul, sendo relevante o acompanhamento da ocorrência de casos nestes locais. No Norte do Brasil existem poucos estudos sobre os reservatórios e sua área de ocorrência dentro dos estados (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A Tabela 1 apresenta os principais reservatórios já identificados e o Hantavírus correlacionado na região Amazônica.

RESERVATÓRIO	ÁREA DE OCORRÊNCIA NA REGIÃO AMAZÔNICA	Genótipos	REF.
<b>Oligorysomys fornesi</b>	Mato Grosso, Oeste do Maranhão	Anajatuba	BONVICINO <i>et al</i> (2008); FIRTH <i>et al.</i> (2012); OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014); SANDOVAL <i>et al.</i> (2010)
<b>O. utiaritensis</b>	Amazonas, Pará, Centro-Oeste do Brasil	Castelo dos Sonhos (CASV)	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2013); OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)
<b>O. moojeni</b>	Amazonas, Pará, Rondônia e Mato grosso	Castelo dos sonhos	FIGUEIREDO <i>et al.</i> (2014)
<b>O. microtis</b>	Bolívia, Peru, Norte do Brasil	Rio Mamoré (RIOMV)	BONVICINO <i>et al</i> (2008); FIRTH <i>et al.</i> (2012); OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014).
<b>O. delicatus</b>	Venezuela	Maporal (MAPV)	DE THOISY <i>et al.</i> (2014)
<b>O. fulvescens</b>	Guiana Francesa	Maripa	DE THOISY <i>et al.</i> (2014)
<b>Holochilus sciureus</b>	Norte do Brasil, Bolívia, Peru, Colômbia, Equador, Venezuela, Suriname, Guiana e Guiana Francesa	Rio Mearin* (RIMEV)	FIRTH <i>et al.</i> (2012); OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)
<b>Calomys callosus</b>	Bolívia	Laguna Negra	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)
<b>C. callidus</b>	Centro-Oeste do Brasil	Laguna Negra	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)
<b>Necromys lasiurus</b>	Leste do estado do Pará, Maranhão, Sudoeste de Rondônia, Mato Grosso, Tocantins	Araraquara (ARAV)	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)
<b>Zygodontomys brevicauda</b>	Colômbia e Guiana Francesa	Calabazo (Colômbia) e Maripa (G. Francesa)	DE THOISY <i>et al.</i> (2014)
<b>Sigmodon alstoni</b>	Venezuela	Caño Delgadito*	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)

<i>S. hispidus</i>	Venezuela e Peru	Black Creek Canal	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)
?	Bolívia	Tunari	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)

**Tabela 1. Principais reservatórios e genótipos de Hantavírus identificados na Região Amazônica.**

### 2.1.3. Epidemiologia

#### *Mundo*

A hantavirose se manifesta de duas formas com características epidemiológicas e clínicas distintas. Na Ásia e Europa (Velho Mundo) a doença é endêmica e se manifesta clinicamente com febre hemorrágica e insuficiência renal aguda, apresentando alta morbidade e baixa mortalidade. É chamada de Febre Hemorrágica com Síndrome Renal causada por Hantavírus (FHSR). Nas Américas (Novo Mundo), a doença apresenta ocorrência esporádica e se manifesta como insuficiência respiratória aguda com baixa morbidade e alta mortalidade. É conhecida como Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (SCPH) (JONSSON *et al.*, 2010; PINTO JUNIOR *et al.*, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

Surtos da doença ocorridos no século passado levaram à correlação do vírus à doença no Velho e no Novo Mundo. Um surto ocorreu durante a Guerra das Coreias (1950-1953) onde mais de 3000 soldados das Nações Unidas adoeceram com a Febre Hemorrágica Coreana, hoje conhecida como a FHSR. A identificação do vírus ocorreu somente na década de 70 (SCHMALJOHN & NICHOL, 2001; JONSSON *et al.*, 2010). Outro surto ocorreu na região de Four Corners, nos EUA, em 1993. Foi chamada inicialmente de Doença de Four Corners, hoje conhecida por SCH (FIRTH *et al.*, 2012; NICHOL *et al.*, 1993). A Hantavirose já foi identificada em vários países e pode se manifestar de forma grave em humanos, apresentando taxas de mortalidade de 12% (FHSR) e 60 % (SCRH) em alguns surtos

#### *América*

Casos de Hantavirose foram identificados em diversos países do continente Americano, a partir da década de noventa. Casos de SCPH já foi identificada em Argentina, Bolívia, Brasil, Canadá, Chile, Colômbia, Costa Rica, Guiana Francesa, Honduras, México, Panamá, Peru, Paraguai, USA, Uruguai e Venezuela. (MATHEUS *et al.*, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2014; MONTOYA-RUIZ; DIAZ; RODAS, 2014). Na América do Sul, somente Guiana, Suriname e Equador não têm registro de casos (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; MONTOYA-RUIZ; DIAZ; RODAS, 2014).

No Brasil, o primeiro caso foi identificado na região de Juquitiba, São Paulo, em 1993. De 1993 a 2016, foram identificados 2019 casos em 19 estados brasileiros (OLIVEIRA, 2012; PINTO JUNIOR *et al.*, 2014, BRASIL, 2016a). Os registros de casos se concentram na região Sudeste, em municípios de Minas Gerais e São Paulo, cobertos pelos biomas Cerrado e Mata Atlântica. A taxa de letalidade da doença variou entre 33% e 100%, dependendo da região onde ocorreram os casos (PINTO JUNIOR *et al.*, 2014). A região Norte, coberta pelo bioma Amazônico, vem apresentando aumento nos registros de casos. No entanto, existe uma lacuna no conhecimento a respeito da doença nessa região. É possível que existam casos subnotificados devido à dificuldade no diagnóstico diferencial de doenças hemorrágicas que ocorrem na região (SANTOS *et al.*, 2012; MONTOYA-RUIZ, DIAZ & RODAS, 2014).

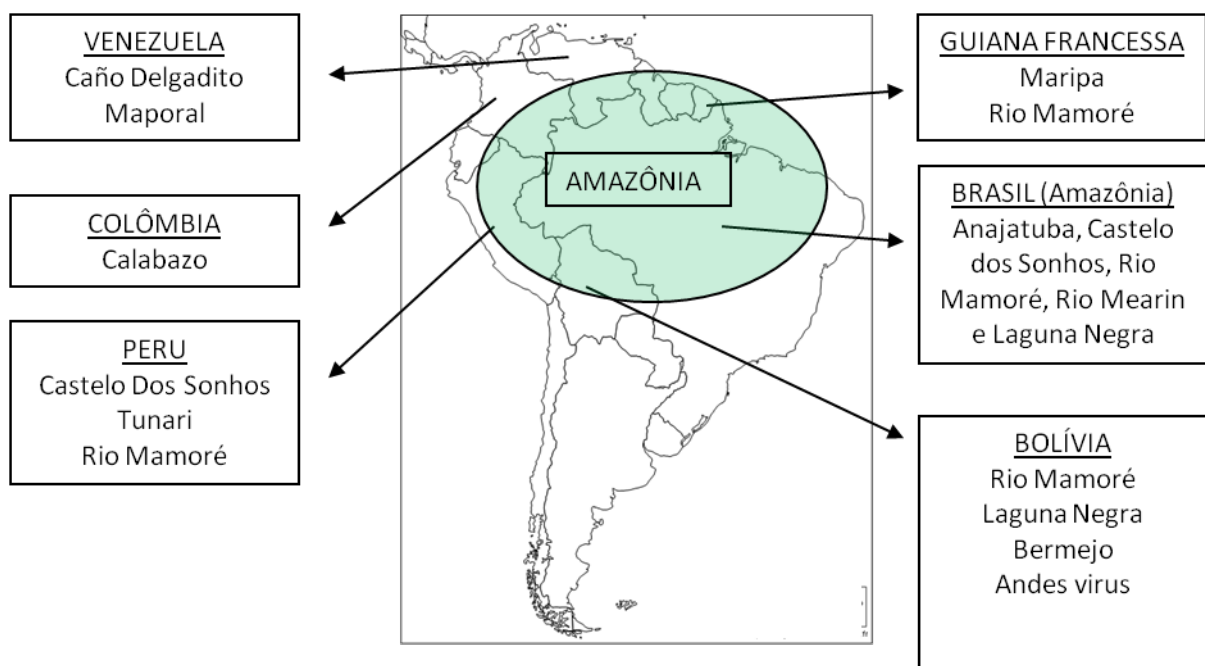
### ***Amazônia***

Tendo em vista que a área de ocorrência de casos hantavirose está interligada com a área de ocorrência do reservatório, é importante que os estudos deem atenção aos biomas onde ocorrem as espécies de reservatórios e os nichos ecológicos aos quais estão inseridas. As áreas desses biomas ultrapassam limites de estados e fronteiras de países (MEDEIROS *et al.*,



2010; FIRTH *et al.*, 2012; FIGUEIREDO *et al.*, 2014; MONTOYA-RUIZ, DIAZ & RODAS, 2014; PINTO JUNIOR *et al.*, 2014)

Os países que possuem o Bioma Amazônico em seus territórios são: Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela. Não há registro de casos de hantavirose na Guiana, Suriname e Equador. Os sorotipos identificados na Amazônia nos países com registro do Hantavírus estão identificados na figura 2.



**Figura 2.** Países que possuem o Bioma amazônico em seu território e os genótipos registrados (DE THOISY *et al.*, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2014; MONTOYA-RUIZ; DIAZ; RODAS, 2014; PINTO JUNIOR, *et al.*, 2014; MONTGOMERY *et al.*, 2012; HJELLE & TORRES-PÉREZ, 2010; DOS SANTOS *et al.*, 2006; ROSA *et al.*, 2005).

No Brasil, os estados que fazem parte da Amazônia Legal e que tem registro de casos de Hantavirose são Amazonas, Mato Grosso, Maranhão, Pará e Rondônia. No período de 1993 a 2016 foram registrados 450 casos (MS/SVS, 2016), conforme tabela 2:

UF	93	94	95	96	97	98	99	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Total	
AM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	6
MA	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	4	0	0	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	12

MT	0	0	0	0	0	0	3	2	10	12	5	9	49	29	22	22	26	48	8	17	23	16	18	4	323
PA	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	2	2	9	15	9	17	15	4	11	4	4	3	3	2	103
RO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	2	0	0	0	6
Total	0	0	1	0	0	0	3	4	13	12	11	15	59	46	32	41	42	53	21	21	30	19	21	6	450

**Tabela 2. Registro de casos confirmados no Sistema de Informação de Agravos Notificados**  
**Fonte:MS/SVS, 2016.**

Estudos demonstram a sobreposição de mapas de dispersão espacial de casos notificados na Amazônia e das áreas com intensa atividade antrópica na região Norte. É o caso da construção de estradas BR 163 e 230. O que se observa nessa região é o avanço da ocupação humana com atividades extrativistas e agropecuárias, no chamado arco do desmatamento, principalmente no Pará e Mato grosso, onde ocorreu o maior número de registros na região Norte (Tabela 2). No Amazonas, nos municípios próximos à Itacoatiara, onde ocorreram as últimas notificações, observa-se um incremento das atividades extrativistas e agropecuárias (MEDEIROS *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2012).

### *Amazonas*

A primeira referência da circulação do vírus no estado do Amazonas ocorreu em 1991, em um inquérito sorológico com familiares e vizinhos de pacientes que morreram com febre hemorrágica sem diagnóstico (VASCONCELOS *et al.*, 1992). Desde então, alguns episódios foram relatados: O Primeiro relato ocorreu no ano de 2004, em Itacoatiara, onde 3 indivíduos de uma mesma família foram infectados, com confirmação por exames laboratoriais. Um quarto indivíduo da mesma família morreu, porém não houve confirmação laboratorial. Este último caso não é contabilizado pelo Ministério da Saúde como caso confirmado da doença. Na investigação epidemiológica, 9 roedores da espécie *Oligoryzomys microtis* foram

capturados sendo 4 foram positivos para anticorpos IgG contra o Hantavírus (DOS SANTOS *et al.*, 2006). A variante RIOMV – 3 foi identificada em estudo posterior de uma das amostras dos 4 roedores positivos (FIRTH *et al.*, 2012). O segundo relato foi no município de Maués, no ano de 2005 (TEIXEIRA *et al.*, 2006; GIMAQUE *et al.*, 2012). O terceiro relato ocorreu no município de Careiro da Várzea, no ano de 2011, com 2 casos confirmados. Um dos pacientes faleceu e amostras do sangue foram coletadas. O vírus identificado foi o RIOMV. Nas investigações epidemiológicas dos casos, o inquérito sorológico identificou 3 pessoas positivas para IgG contra o Hantavírus (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014). Segundo FIRTH *et al.*, (2012) mais 3 casos (1 no ano de 2008; 2 no ano de 2009) ocorreram. No entanto, não existe registro na base de dados do Ministério da Saúde (SINAN WEB). Um Levantamento sorológico em humanos realizado em quatro municípios do estado do Amazonas (Itacoatiara, Lábrea, Careiro Castanho e Atalaia do Norte) obteve resultados de soroprevalência do Hantavírus de 0,2%, 0,9%, 0,4% e 0,8%, respectivamente (GIMAQUE *et al.*, 2012).

#### **2.1.4. Fatores de transmissão**

A epidemiologia da Hantavirose está ligada à interação entre os elementos que fazem parte da transmissão do Hantavírus: os hospedeiros (definitivo e acidental), o ambiente e o vírus.

A dinâmica vírus-hospedeiro-ambiente precisa ser bem compreendida para o entendimento dos riscos de infecção em humanos (OLIVEIRA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

#### ***Fatores ligados aos hospedeiros***

O hospedeiro definitivo ou reservatório tem um papel relevante na manutenção do vírus no ambiente. Análises filogenéticas demonstram a longa co-divergência evolucionária entre as espécies de hantavírus sendo acompanhada pela tipo de reservatório, geralmente, possibilitando correlacionar que espécie de vírus determinado reservatório pode transmitir (GUO *et al.*, 2013). Essa relação vírus-reservatório possibilita estimar as possíveis áreas de circulação de vírus transmitidos por determinadas espécies de roedores, baseado no conhecimento sobre a dispersão e a área de ocorrência dos roedores reservatórios (GUO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014). A capacidade de adaptação dos reservatórios à ambientes preservados e com interferência humana determinam as áreas de ocorrência e dispersão do vírus (OLIVEIRA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014). A dispersão da hantavirose também é influenciada pelo aumento no adensamento populacional dos roedores, elemento primordial para o surgimento de epidemias do Hantavírus (ENGELTHALER *et al.*, 1999). O tamanho populacional das espécies de roedores é determinado pelo uso do ambiente pelo homem, mudanças climáticas ou variações cíclicas normais que afetam as espécies, e que podem ameaçar a saúde humana (SCHMALJOHN & NICHOL, 2001). Esses fatores influenciam a reprodução, a disponibilidade de alimentos e a presença de predadores (ENGELTHALER *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Roedores vivem em colônias e o comportamento competitivo, reprodutivo e alimentar auxiliam na manutenção da circulação do vírus entre os roedores do grupo (OLIVEIRA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

O homem é o hospedeiro acidental deste ciclo e se infecta ao entrar em contato com roedores infectados ou ao inalar aerossóis dos dejetos destes roedores quando divide o mesmo espaço com esses animais. Isso ocorre quando o hospedeiro acidental invade a área de ocorrência de roedores (atividades de desmatamento, expansão imobiliária, atividades de lazer em áreas de ocorrência do reservatório, treinamento militar, etc.) ou quando atrai animais infectados para próximo das habitações (residências próximas a áreas de mata, atividades

agropecuárias, armazéns para estocagem de alimentos, etc.). ( JONSSON; 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013; ZEIER *et al.*, 2005; ENGELTHALER *et al.*, 1999;):

### ***Fatores ligados ao ambiente***

Espécies de roedores evoluíram em milhões de anos dentro de biomas específicos. As alterações ambientais promovidas pelo processo de ocupação do homem na terra fizeram com que biomas sofressem mudanças, modificando a dinâmica populacional desse grupo de animais. Algumas espécies de roedores têm maior capacidade de se adaptar à novos ambientes ou à ambientes degradados. São chamadas de espécies generalistas ou oportunistas. Essa espécies se proliferam com mais facilidade quando o ambiente lhes é favorável, sendo potenciais reservatórios dispersores do hantavírus. A disponibilidade de alimentos, regime de chuvas, flutuações climáticas sazonais, fenômenos climáticos atmosférico-oceânicos são outros fatores que ajudam a influenciar as populações de roedores (ZEIER *et al.*, 2005; JONSSON *et al.*, 2010; DEARING; DIZNEY, 2010; HEYMAN *et al.*, 2012)

Alterações ambientais resultantes da destruição, fragmentação, degradação do habitat, superexploração das espécies, introdução de espécies exóticas e aumento da ocorrência de doenças têm grande impacto na diversidade biológica (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Essas alterações favorecem a emergência de doenças. Em habitat fragmentados, por exemplo, pode ocorrer um aumento temporário da relação animal/área, favorecendo a transmissão de doenças entre indivíduos de um mesma espécie. Outro efeito indireto da destruição e degradação ambiental é o aumento da susceptibilidade de organismos à doenças em razão da deteriorização da qualidade do habitat e da diminuição da disponibilidade de alimentos. Além disso, o incremento no contato entre diferentes espécies pode favorecer o contato e a transmissão de doenças, podendo afetar espécies ameaçadas ou favorecer o “spillover” de

patógenos entre diferentes espécies. (PRIMACK & RODRIGUES, 2001; DEARING & DIZNEY, 2010; WITKOWSKI *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Um exemplo da influência do clima no ambiente ocorreu no surto de Four Corner, nos EUA, em 1993, e teve relação com o fenômeno do El Niño ocorrido no mesmo ano. A elevação da precipitação ocorrida na região aumentou a disponibilidade de alimentos e, por consequência, as populações de roedores reservatórios do hantavírus, elevando o risco de transmissão da doença (ENGELTHALER *et al.*, 1999).

No Brasil, as alterações no ambiente podem ter favorecido o aumento populacional de algumas espécies de roedores incrementando a transmissão do Hantavírus. As espécies *Necromys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes* são as principais responsáveis pela transmissão do Hantavírus no Brasil. A espécie *N. lasiurus* é encontrada em áreas alteradas pela expansão agrícola e urbana e a flutuação anual dessa população parece ter relação com a disponibilidade de alimentos, influenciada pelo regime de chuvas. A espécie *O. nigripes* ocupa matas de galeria e matas secundárias. Os fatores temperatura e precipitação parecem influenciar a distribuição desta espécie pelo país (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Na Amazônia, alterações ambientais como desmatamento (DOS SANTOS *et al.*, 2006), extrativismo, construção de estradas, avanço das áreas de urbanização e da agropecuária favorecem o contato entre humanos e reservatórios possibilitando o surgimento de novos casos (MEDEIROS *et al.*, 2010).

### ***Fatores ligados ao vírus***

Os fatores ligados ao vírus são o tempo que o vírus permanece sendo eliminado pelo hospedeiro, o tempo que resiste no ambiente, e a capacidade do vírus de infectar o reservatório sem debilitá-lo. Cada espécie de Hantavírus parece estar bem adaptada a uma

espécie de reservatório. O hospedeiro definitivo ou reservatório quando infectado não demonstra alterações clínicas apesar de estar cronicamente infectado. Esses animais apresentam altos níveis de anticorpos neutralizantes, no entanto, permanecem longos períodos em viremia, eliminando vírus no ambiente. Os vírus são secretados no ambiente através da saliva, urina, fezes e sangue. (JONSSON *et al.*, 2010). Estudo realizado demonstrou que o roedor *Myodes glareolus*, reservatório do vírus PUUV, ao ser infectado, permaneceu 80 dias eliminando o vírus na saliva (KALLIO *et al.*, 2007).

### **2.1.5 Sentinelas**

A função das sentinelas é a de sinalização de ameaças do ambiente à saúde humana. Na vigilância epidemiológica, as sentinelas tem relevância para a identificação e o monitoramento de surtos de doenças emergentes (SCOTCH; ODOFIN; RABINOWITZ, 2009). Grupos de risco para determinadas doenças também podem desempenhar a mesma função dentro da vigilância epidemiológica.

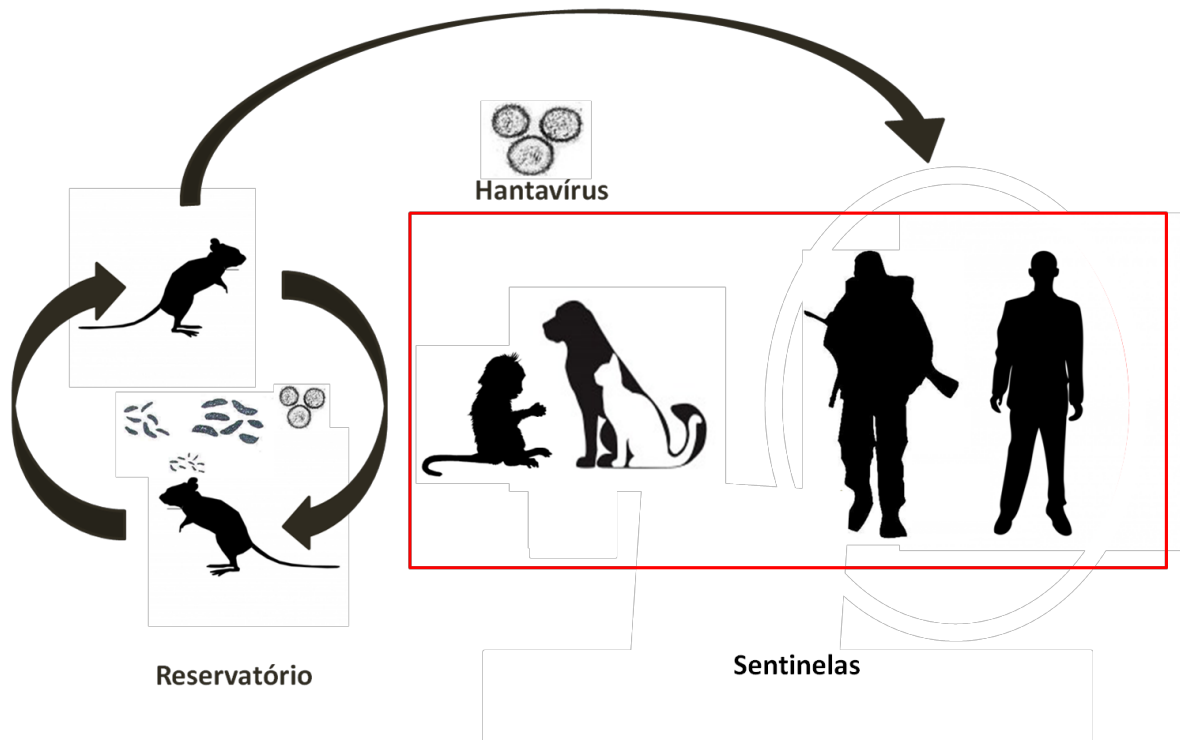
### ***Animais***

Animais que coabitam ou transitam dentro das áreas de ocorrência do reservatório roedor podem entrar em contato com o Hantavírus sem desenvolver a doença. No entanto, montam resposta imunológica ao antígeno, produzindo anticorpos contra o vírus, que podem ser medidos no soro (DOBLY *et al.*, 2012). Diversos animais já foram identificados apresentando anticorpos contra o Hantavírus como bovinos, javalis, aves, coelhos (ZEIER *et al.*, 2005), e gambás (ROMANO-LIEBER; YEE; HJELLE, 2001)

Cães e gatos possuem comportamento de caça e de exploração natural, o que facilita o contato com doenças de outras espécies. Por serem numerosos e viverem próximos aos humanos podem desempenhar a função sentinela, isto é, a de sinalização da ameaça da circulação do vírus próximo a residências antes que ocorram casos humanos. Neste caso, a investigação sorológica das espécies domésticas pode funcionar como importante ferramenta de vigilância epidemiológica (DOLBY *et al.*, 2012; FIGUEIREDO *et al.*, 2010; SCOTCH *et al.*, 2009; ZEIER *et al.*, 2005; LEIGHTON & ARTSOB, 2001;). Segundo dados da Secretaria Municipal de Saúde – SEMSA (2015), a cidade de Manaus possui aproximadamente 310.000 cães domiciliados e semi-domiciliados. A investigação da presença de anticorpos nessa população pode fornecer informações a respeito da circulação do vírus na Amazônia Central, principalmente na região mais habitada do estado, que é a cidade de Manaus. Não se sabe o quantitativo de cães errantes.

A pesquisa sorológica em animais selvagens também pode ser uma importante ferramenta de vigilância epidemiológica. Esses animais coabitam áreas de ocorrência de reservatórios e podem ter o contato direto com esses animais (Figura 3). Essa investigação já é realizada com outros vírus como o da Febre amarela, da Febre do Oeste do Nilo e da SARS (SCOTCH, ODOFIN, RABINOWITZ, 2009).





**Figura 3. Ciclo de transmissão do Hantavírus:** Ciclo de transmissão horizontal do reservatório pelo contato com aerossóis de dejetos e fluidos corporais; O homem é o hospedeiro acidental do ciclo e desenvolve a FHSR ou SCH; Animais selvagens e domésticos não desenvolvem doença, no entanto produzem anticorpos contra o vírus podendo funcionar como sentinelas para a presença do vírus; algumas atividades humanas, como a militar, podem facilitar o contato do homem com o vírus funcionando como grupos sentinelas para a doença.

### ***Humanos***

Algumas atividades humanas, tanto de lazer como profissionais, podem facilitar o contato com roedores e seus dejetos nas áreas endêmicas. Algumas ocupações profissionais são conhecidas por se exporem com mais frequência como militares, operários de construção civil, caçadores de roedores, trabalhadores rurais, fazendeiros, madeireiros, lenhadores, habitantes de florestas, campistas, etc (JONSSON *et al*, 2010; NEWMAN *et al.*, 2014). Todos podem ser monitorados e funcionarem como sentinelas para determinadas doenças.

Atividades militares são bastante citadas na literatura como atividade com alta prevalência para infecção com o Hantavírus. Os conflitos militares auxiliaram no conhecimento mais profundo à respeito da doença, que era conhecida como Nefrite do

Campo. As primeiras evidências da ocorrência do vírus em conflitos foi na 1ª Guerra Mundial (1914-1918), em soldados das tropas aliadas e Alemãs, que travaram combate em uma guerra estática em trincheiras. Outro registro ocorreu na invasão da Manchúria pelos Japoneses, na 2ª Grande Guerra (1939 -1945). Além destes, o mais importante para a identificação do agente viral ocorreu na Guerra das Coreias (1950 – 1953), onde 3000 soldados desenvolveram febre aguda com síndrome renal e sintomas hemorrágicos, onde a taxa de óbito foi de 5 – 10% (JONSSON *et al*, 2010; SCHMALJOHN; NICHOL, 2001).

Militares podem se expor em atividade de treinamento ou em ações de conflito em regiões endêmicas para o Hantavírus (Figura 3). Quando militares são empregados em outros países, precisam se deslocar e atuar em diferentes ambientes se expondo às doenças endêmicas e emergentes destes locais. É possível que este grupo que seja mais vulnerável e que a transmissão de doenças seja facilitada pela imunossupressão causada pelo estresse de combate, tanto em ações reais como em treinamentos. Estes profissionais podem ser considerados como grupo sentinela e ferramenta de vigilância epidemiológica (SCHMALJOHN & NICHOL, 2001; JONSSON *et al*, 2010; DEARING & DIZNEY, 2010; CLEMENT *et al.*, 2012; HEYMAN *et al.*, 2012; OLIVIERENGLERBABSADMINCH *et al.*, 2013; NEWMAN *et al.*, 2014).

A Amazonia possui militares distribuídos por toda a sua extensão desempenhando a função de defesa territorial. Esses militares atuam em áreas de selva preservada e podem se expor mais facilmente a formas silvestres de doenças. A detecção de doenças emergentes nesse grupo pode funcionar como ferramenta de vigilância epidemiológica importante para a população que vive na Amazônia.

O Amazonas apresenta prevalência para outras doenças hemorrágicas (Dengue, Febre Amarela, febre hemorrágicas causadas por Arenavírus, etc.) com sinais clínicos semelhantes à Hantavirose que necessitam de diagnóstico diferencial, o que reforça a preocupação sobre a

prevalência do Hantavírus e a possibilidade de transmissão para grupos de risco (FIGUEIREDO, 2006).

Segundo FIRTH *et al.*, (2012) dois clados na filogenia do Hantavírus ocorrem na América do Sul, dando-se ênfase para a Região Amazônica: ANDES (ANDV), e RIO MAMORÉ (RIOMV). No Amazonas, os registros são com os genótipos Castelo do Sonhos (Clado ANDV) e Rio Mamoré (Clado RIOMV). Estes dados são importantes para a metodologia que será utilizada no presente estudo.

No presente estudo será realizada a soroprevalência do Hantavírus em militares e civis no município de Manaus. Será também aplicado questionário sociodemográfico aos participantes do estudo para compreensão de fatores sociais e ambientais envolvidos na circulação do vírus. Com o estudo, busca-se trazer mais informações sobre a soroprevalência do Hantavírus no município de Manaus e utilizar ferramentas epidemiológicas que auxiliem no monitoramento desta doença que não tem imunoprofilaxia e tratamentos disponíveis e que tem altos índices de mortalidade nas Américas.

## **2.2. OBJETIVOS**

### **Geral**

O presente estudo tem por objetivo estimar a soroprevalência da Hantavirose em militares e civis no município de Manaus.

### **Específicos**

- Clonar e expressar Proteína do Nucleocapsídeo recombinante do Hantavírus a partir dos genótipos circulantes na Região Amazônica para utilização em imunoenensaio;
- Estimar a soroprevalência do Hantavírus em moradores da área urbana de Manaus.
- Estimar a soroprevalência do Hantavírus em militares que atuam em áreas florestadas no município de Manaus;
- Identificar e comparar os fatores sociodemográficos e de risco relacionados a infecção por hantavírus em Militares e civis.

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.3.1 Delineamento e população do estudo

Trata-se de estudo transversal. A investigação é para estimar a prevalência do Hantavírus em militares e civis e para avaliar a relação das amostras positivas com dados sociodemográficos e possíveis fatores de risco, entre janeiro de 2014 a março de 2016. O presente estudo faz parte de um projeto maior de investigação da prevalência do Hantavírus no Amazonas e de desenvolvimento de métodos diagnósticos para detecção do vírus financiando pela FAPEAM. O tamanho da população a ser estudada foi calculado no OpenEpi (<http://www.openepi.com>), utilizando dados populacionais do Datasus e da Secretaria de Saúde de Manaus. As amostras foram coletadas em duas populações:

- 1) **População Civil:** Amostras de conveniência de civis, moradores de Manaus, foram coletadas no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade, de janeiro de 2015 a março de 2016. A justificativa para a coleta nessa instituição foi de estimar soroprevalência do hantavírus em animais domésticos e seus proprietários. Essa abordagem faz parte do projeto maior, no entanto, para o presente estudo, utilizou-se as amostras dos proprietários de animais, como representativo da população civil, e para comparação com os dados gerados do grupo dos militares. Foram coletadas 547 amostras de proprietários de animais domésticos que utilizaram os serviços do CCZ, nesse período. Aos participantes, foi solicitado a concordância da participação no projeto através da assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e de preenchimento de um questionário com dados sociodemográficos e epidemiológicos (APÊNDICE D e E).

2) **Militares:** Foram coletadas amostras de militares do Exército Brasileiro que atuam na Região Amazônica. As amostras são de conveniência e foram coletadas no Centro de Instrução de Guerra na Selva (CIGS), que se localiza em Manaus, no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2015. Parte das amostras são de participantes do Curso de Operações na Selva (COS), oferecido pelo Centro de Instrução. Este grupo é composto por militares oriundos de quartéis espalhados pela Amazônia. O curso se desenvolve em Manaus e Rio Preto da Eva, em uma área de treinamento localizada entre os dois municípios. A área possui 1750 km<sup>2</sup> de selva preservada, onde os militares aprendem a sobreviver e combater neste ambiente, durante o período de 3 meses. A outra parte das amostras são de jovens adultos cumprindo serviço militar obrigatório no Centro de Instrução. Esse grupo também passa por treinamento militar na área que acontece o curso de operações na selva, porém de menor duração. Em virtude da frequência com que transitam nas áreas de selva, onde possivelmente circulam espécies de reservatórios, militares tem mais risco de contato. Foram coletadas amostras pareadas (início e término de treinamento) de 526 militares. Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e um questionário (Apêndices D e F) foram aplicados aos militares antes do início do treinamento para melhor entendimento de fatores de risco anteriores à chegada. Para a realização dos testes, foram utilizadas as amostras coletadas no término do treinamento.

O desfecho principal é a detecção de amostras positivas para IgG contra o Hantavírus em militares e civis.

As coletas das amostras foram realizadas por venipunção da veia cefálica, utilizando o sistema à vácuo para coleta em tubos com EDTA. Foram coletados 5 ml de sangue dos participantes do estudo. Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas para separação do plasma da porção celular e o material resultante foi estocado em tubos de microcentrífuga à temperatura de – 80°C.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) sob o nº569.240 de 26/03/2014, para coleta de amostras em animais e humanos. Foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) a todos os participantes (militares e civis). Um questionário socioeconômico foi aplicado para entendimento dos fatores de risco para a transmissão do vírus em militares e civis.

### **2.3.2 Produção, extração e purificação da proteína N\_AM\_Hanta**

#### ***Sequência de aminoácidos consenso do nucleocapsídeo do Hantavírus***

Selecionou-se cepas de três clados das espécies de Hantavírus que ocorrem na América do sul. Foram selecionadas cepas identificadas em estudos anteriores na Região Amazônica ou que fossem representativas dos clados. Todas possuíam registro das sequências de aminoácidos da proteína do nucleocapsídeo completas no Banco de dados de sequências genéticas (GenBank) do Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos Estados Unidos da América. As sequências de aminoácidos foram alinhadas e analisadas para gerar uma sequência consenso. Foram utilizados 10 genótipos de Hantavírus do clado ANDES (7 genótipos de Andes Vírus e 3 genótipos de Castelo dos Sonhos) e 2 genótipos da Espécie Rio Mamoré do clado RIO MAMORÉ (RIOMV), conforme FIRTH *et al.* (2012).

Com a sequência consenso construída, um estudo filogenético foi realizado comparando-a com sequências de aminoácidos de diversos genótipos de Hantavírus disponíveis no banco de dados do *GenBank*. Foram analisadas as distâncias e as similaridades da sequência consenso com os genótipos selecionados, com o auxílio dos programas MEGA 7 e figTree 1.4.2.

Após a sequência de aminoácidos consenso ter sido gerada, foi realizada a otimização de códons para utilização em bactérias *Escherichia coli* e assim obteve-se a sequência nucleotídica mais adequada para ser utilizada neste sistema de expressão. Para isso, utilizou-se a ferramenta *online* (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) e a edição da otimização foi manual.

À sequência nucleotídica gerada, foram adicionadas: Sequências nucleotídicas referentes as enzimas de restrição (EcoRI, NdeI, NotI, BamHI e HindIII); Sequências nucleotídicas referentes ao His6x-Tag (6 códons de histidina); Sequências nucleotídicas referentes a enteroquinase e Sequências nucleotídicas referentes às sequências que param a expressão de proteínas (Stop códons) distribuídas no início e no final da sequência (Tabela 3).

Estruturas adicionadas	Sequência nucleotídica	Localização na sequência
EcoRI	GAA TTC	5'
NdeI	CAT ATG	5'
His6x-Tag	CAT CAC CAT CAC CAT CAC	5'
Enteroquinase	GAT GAC GAT GAC AAA	5'
Stop códons (3x)	TAA CTG ACT AGG	3'
HindIII	AAG CTT	3'
NotI	GCG GCC GC	3'
BamHI	GGA TCC	3'



**Tabela 3. Estruturas adicionadas à sequência consenso.**

A sequência final foi enviada a uma empresa privada (GenOne Biotechnologies) para a síntese e inserção em plasmídeo para clonagem. O plasmídeo de envio pela empresa foi o pBluescript II SK (pBSK) desprovido de sítio múltiplo de clonagem e a sequência sintetizada foi colocada dentro do sítio EcoRV.

***Linhagens bacterianas, meios de cultivo, processo de estocagem e plasmídeos utilizados***

As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas para as etapas de clonagem e expressão constam na tabela a seguir:

Linhagem ( <i>E. coli</i> )	Utilização no trabalho
DH5 $\alpha$	Clonagem
BL21(DE3)	Expressão

**Tabela 4. Linhagens bacterianas utilizadas no estudo.**

As linhagens citadas cresceram em meio LB (Lysogeny Broth) e foram tornadas eletrocompetentes (conforme protocolo do apêndice G) para inserção do plasmídeo de interesse. O produto final com as bactérias foi distribuído em alíquotas, e estocados à temperatura de -80°C.

Os plasmídeos utilizados para clonagem e expressão constam na tabela a seguir:

Plasmídeos	Utilização no trabalho
pBSK	Clonagem
pGS 21a modificado	Expressão

Tabela 5. Plasmídeos utilizados no estudo

O plasmídeo pBSK foi utilizado pela empresa que sintetizou a sequência consenso para clonagem e envio (Figura 4). O plasmídeo pGS 21a modificado foi cedido pelo Laboratório de Tecnologia de DNA/CAM/UFAM (figura 5) e apresentava modificação nas enzimas de restrição utilizadas, retirando SacI, Sall e HindIII e inserindo NdeI, HindIII e BamHI a partir das enzimas de restrição EcoRI e NotI, conforme (WÖHLKE, 2012).

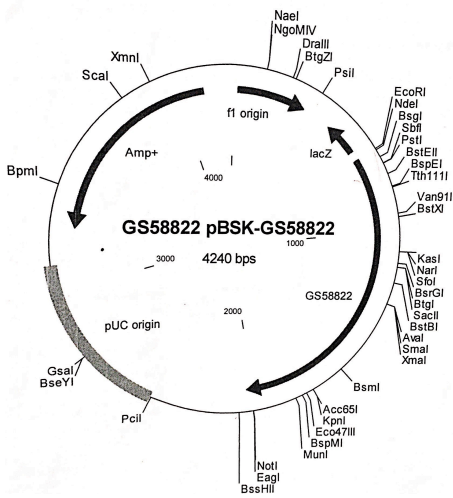


Figura 4. Plasmídeo pBSKN\_AM\_Hanta sintetizado

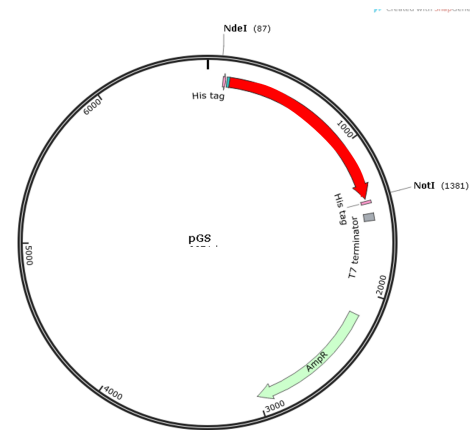


Figura 5. O plasmídeo pGS 21a modificado foi cedido pelo Laboratório de Tecnologia de DNA/CAM/UFAM

### *Clonagem e extração do pBSKN\_AM\_Hanta e do pGS modificado em E. Coli DH5α*

Para a clonagem dos plasmídeos foram utilizadas as *E. coli* DH5α como hospedeiras. Ao plasmídeo pBSK, foi inserida a sequência consenso, sendo denominada

pBSKN\_AM\_Hanta. Foram seguidas as orientações do fabricante para a ressuspensão do material.

A transformação das hospedeiras ocorreu por eletroporação. Poros na parede e na membrana celular são abertos quando são aplicadas descargas elétricas de alta voltagem em milissegundos. Esse processo permite a entrada de DNA exógeno para dentro da célula.

Para a transformação das hospedeiras, retirou-se do estoque, a  $-80^{\circ}\text{C}$ , dois tubos contendo  $80\ \mu\text{L}$  de solução concentrada com DH5 $\alpha$  eletrocompetentes (conforme protocolo do apêndice G). Esses tubos foram mantidos por 30 minutos em gelo para elevação da temperatura. Em seguida, foram adicionados aos tubos, separadamente,  $1\ \mu\text{L}$  das soluções contendo os plasmídeos utilizados (pBSKN\_AM\_Hanta e PGS21a modificado). Os tubos foram homogeneizados e as soluções adicionadas às cubetas de eletroporação (2mm), com o auxílio de uma pipeta de precisão. As cubetas foram depositadas sequencialmente em eletroporador (2510 *Eppendorf*<sup>®</sup>) e dois pulsos elétricos de 1900 V foram aplicados a cada tubo. A seguir, as células transformadas foram ressuspensas em  $450\ \mu\text{l}$  de meio LB, e o material foi transposto para microtubos de centrifugação de 1,5 mL. Logo após, os tubos foram encubados em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  e em agitação (150 rpm) por 2 horas. O material encubado foi plaqueado em LB ágar a 1,5 % com antibiótico Ampicilina (100 mg/mL) por 16 horas. As colônias formadas foram transferidas a tubos de ensaio contendo 5 ml de LB líquido com antibiótico Ampicilina (100 mg/ml) e encubadas, novamente, a  $37^{\circ}\text{C}$ , em agitação (150 rpm), por 16 horas.

O material resultante foi centrifugado a 12.000 rpm. Do sedimento isolado, foi extraído e purificado o DNA plasmídial por Kit comercial de extração Illustra<sup>™</sup> plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare Life Sciences). O material final foi analisado em gel de agarose

a 0,8% adicionado de Brometo de Etídio (0,01%), com a corrida de eletroforese de na potência de 100 W e na voltagem 100 V por 40 min.

***Digestão do plasmídeo PBSKN\_AM\_Hanta, separação do inserto de interesse e ligação ao plasmídeo de expressão pGS21a modificado***

Para a digestão, uma preparação analítica com volume final de 10 $\mu$ L foi realizada para verificação da eficiência do sistema, conforme protocolo do APENDICE J (tabela 18). Após a preparação do sistema de digestão, os microtubos foram encubados a 37°C por 2 horas. Logo após, o material resultante foi analisado em gel de agarose a 0,8 %, acrescido de 0,01% de Brometo de Etídio, e a cada poço foi adicionado 10  $\mu$ L do sistema acrescido de 3  $\mu$  de TBE-EDTA 5x . A linearização do pGS21a, a linearização do pBSK e a liberação do inserto N\_AM\_Hanta ocorreu como o esperado, conforme o gel da figura 13 (resultados).

Uma digestão com maior volume foi realizada para posterior separação do gel de agarose das estruturas de interesse, o vetor de expressão (pGS21a) e o inserto (N\_AM\_Hanta). O protocolo utilizado foi para o volume de 50 $\mu$ L, conforme a tabela 19 do APENDICE J.

O material da digestão foi encubado a 37°C por 2 horas. O material final foi separado em gel de agarose a 0,8% acrescido de 0,01 de Brometo de Etídio. As estruturas de interesse (pGS21a modificado e N\_AM\_Hanta) foram cortadas do gel com ajuda de um estilete e o material foi extraído e purificado com kit (GFX™ PCR DNA and gel band purification kit – GE Healthcare)

### ***Ligação dos fragmentos de interesse***

Para o sistema de ligação, foram utilizados o plasmídeo pGS21a e o inserto N\_AM\_Hanta. O protocolo utilizado na tabela 20 do APENDICE J.

O material foi encubado a 16°C por 10 horas. A seguir, um gel para visualização do plasmídeo com o inserto N\_AM\_Hanta foi preparado. E após, um novo sistema de digestão foi repetido para certificação da correta ligação.

O novo plasmídeo foi enviado para sequenciamento na Plataforma de genômica da ILMD/Fiocruz e para a confirmação da síntese correta do inserto. Foi realizado em colaboração do Setor de Genômica da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD). Para a reação de sequenciamento utilizou-se o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific, EUA). Foram seguidas as especificações do fabricante, além das modificações da plataforma proposta por NAVECA; *et al.* (2012). Utilizou-se para cada reação 150 a 300 ng dos plasmídeos e primers na concentração final de 0,32 µM que se ligam aos sítios próximos dos promotores do vetor (T7 Forward: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' e T7 Reverse: 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'). A reação de sequenciamento foi desenvolvida por meio de sequenciamento capilar de ácidos nucleicos do tipo Sanger no sequenciador automático *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), utilizando um gel de poliacrilamida a 6%.

### ***Clonagem e expressão do pGSN\_AM\_Hanta em E. Coli BL21DE3***

Para a transformação da hospedeira de expressão BL21(DE3), retirou-se do estoque, a menos 80°C, um tubo contendo 80 µL de solução concentrada com as bactérias eletrocompetentes. Esses tubos foram mantidos por 30 minutos em gelo para elevação da temperatura. Foi adicionado 2µL da solução contendo o plasmídeo pGSN\_AM\_Hanta. O tubo foi homogeneizado e a solução adicionada à cubetas de eletroporação (2mm), com o auxílio de uma pipeta de precisão. A cubeta foi colocada em eletroporador (2510 *ependorf*®) e dois pulsos elétricos de 1900 V foram aplicados ao tubo. A seguir, as células transformadas foram ressuspensas em 450 µl de meio LB, e o material foi transposto para microtubo de centrifugação de 1,5 mL. Logo após, o tubo foi encubado em estufa a 37°C e em agitação (150 rpm) por 2 horas. O material encubado foi depositado em placas de petri contendo LB ágar a 1,5 % com antibiótico ampicilina (100 mg/mL) por 16 horas. As colônias formadas foram adicionadas a 4 tubos de ensaio contendo 5 ml de LB líquido com antibiótico Ampicilina (100mg/ml) e encubados, a 37° C, em agitação (150 rpm), por 16 horas. Junto aos 4 tubos, foi encubado mais um tubo com 5 ml de LB líquido com uma alíquota de BL21(DE3) não transformada do estoque a -80 °C. Estes 4 tubos de ensaio semeados com as hospedeiras transformadas e o tubo com a hospedeira não transformada forma pré-inóculos para a fase de expressão.

Na fase da expressão, foram preparados 5 erlenmeyer, com tampas confeccionadas com algodão envolto em gaze. Cada frasco possuía 250 ml de LB líquido. Todo este material foi autoclavado a 120°C por 15 minutos. A semeadura com os pré-inóculos foi realizada preparando-se 4 erlenmeyers com BL21(DE3)+pGSN\_AM\_Hanta e 1 erlenmeyer com BL21(DE3) não transformada. Todos os frascos foram acondicionados em estufa a 30°C com agitação de 150 rpm. A cada 30 minutos, uma alíquota de 1 ml era retirada dos frascos para medir a densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 600 nm. Essa medida objetivava monitorar a chegada do crescimento bacteriano ao início da fase logarítmica (entre 0,6 a 0,8).

Ao atingir a faixa de absorvância esperada, foi adicionado Isopropyl- $\beta$ -D-Galactose (IPTG), a uma concentração final de 1mM, aos frascos contendo a hospedeira transformada, para indução da expressão proteica. A partir da indução, alíquotas de 1 ml foram retiradas dos frascos, a cada hora, para visualização e confirmação da expressão da proteína em gel. A duração do processo foi de 5 horas após a indução. O produto final foi centrifugado a 4000 rpm (10 minutos, a 4°C) concentrando o material particulado de cada erlenmeyer em um tubo de 50 ml, desprezando-se o sobrenadante. Os tubos com o sedimento foram armazenados a temperatura de -80°C. A expressão foi analisada em gel de Poliacrilamida-SDS (Mini PROTEAN® electrophoresis system) e corado com azul de coomassie. Realizou-se a eletroforese a 200v (iniciando com 25mA e aumentando para 50 mA) por aproximadamente 45 minutos.

### ***Extração e solubilização da proteína N<sub>AM</sub> Hanta***

O processo de extração da proteína iniciou-se com a retirada do estoque a -80°C de um dos tubos de 50 ml com contendo o sedimento com a hospedeira+PGSN<sub>AM</sub> Hanta pós expressão e o tubo de 50 ml com o sedimento com a hospedeira sem o plasmídeo. Os tubos foram mantidos em gelo durante todo o processo para inibir a ação de proteases. No APENDICE H estão relacionados os tampões utilizados na extração e na purificação da proteína de interesse.

Aos tubos, foram adicionados 10 ml do tampão de lise (Tampão A) + 100  $\mu$ L Lisozima (100 mM) e 500  $\mu$ L PMSF (1mg/mL). A lisozima auxilia na lise da parede celular das bactérias. O PMSF (fluoreto de fenil sulfonil) é um inibidor de proteases. O material foi homogeneizado até a dissolução do Pellet formado e mantido por 30 minuto no gelo. Após, o

material foi agitado em sonicador ultrasônico (200 W – 20 khz - sonicador QR200/ULTRONIQUE), em gelo, em 5 ciclos de 30 segundos com intervalo de 20 segundos. A seguir, centrifugou-se a 4000rpm, a temperatura de 4°C. O sobrenadante (SOBRENADANTE 1) foi separado para análise em gel. O sedimento (PELLET 1) foi ressuspenseo em Tampão desnaturante (Tampão B), homogeneizado, e mantido a 4 °C por 30 minutos. Após, o material foi centrifugado, a 4000 rpm, a temperatura de 4°C. O processo seguiu o esquema da FIGURA 6. O sobrenadante (SOBRENADANTE 2) e o sedimento (PELLET 2) foram armazenados para análise em gel. Os três produtos desse processo (SOBRENADANTE 1, 2 e PELLET2) foram analisados em gel de Poliacrilamida-SDS (Mini PROTEAN® electrophoresis system) corado com azul de coomassie. Realizou-se a eletroforese a 200 V (Iniciando com 25 mA e aumentando para 50 mA) por aproximadamente 45 minutos. Verificou-se a solubilidade da proteína em condições de lise e desnaturantes (figura 6).



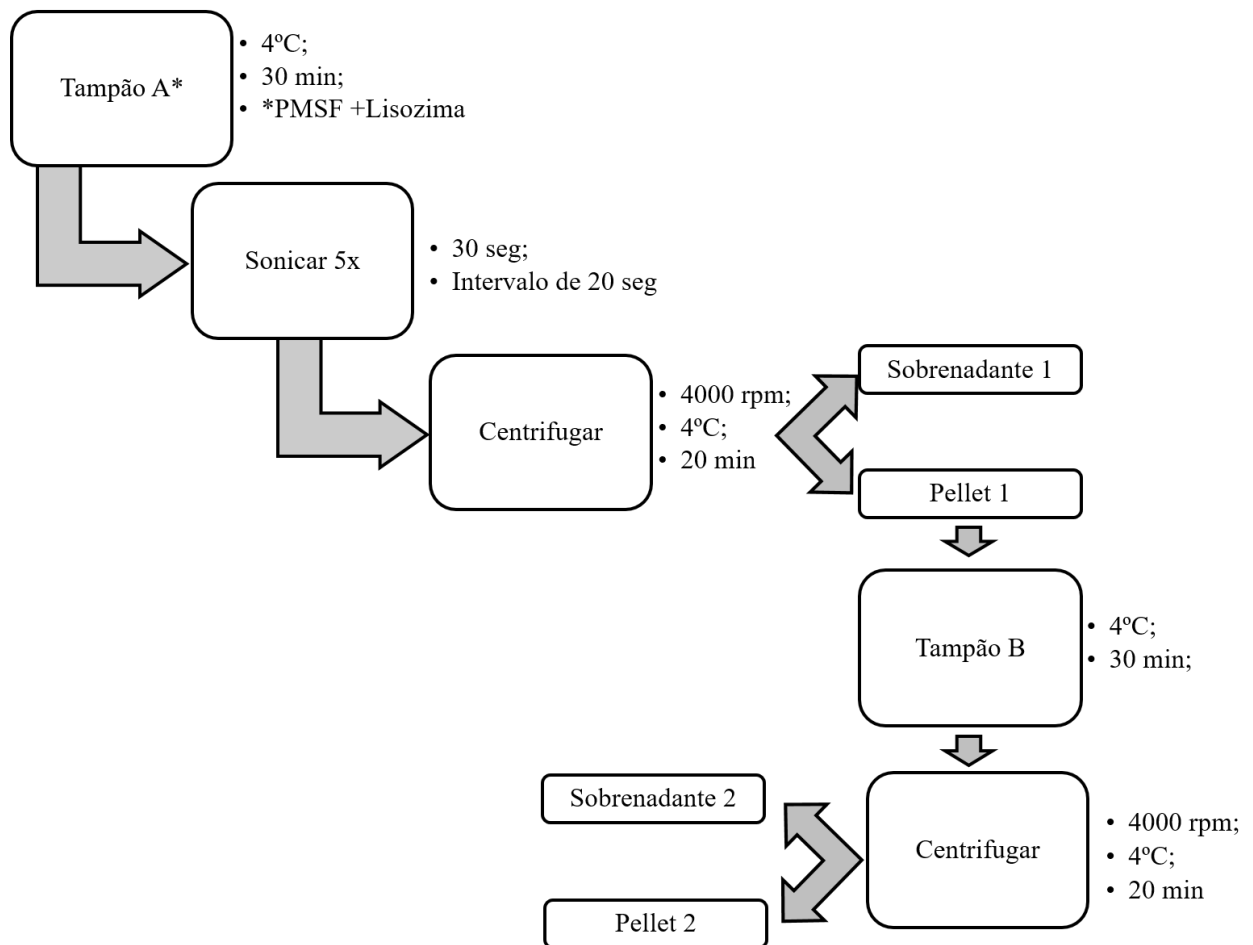


Figura 6. Sequência das ações para extração da proteína não solúvel da hospedeira.

### 3.2.8. Purificação da fração da Proteína N\_AM\_Hanta

A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando coluna de níquel (IMAC – Immobilized metal affinity chromatography), baseado na afinidade deste metal à cauda de histidina (His6x tag) inserida na proteína recombinante N\_AM\_Hanta. A coluna níquel utilizada foi para a capacidade de 1ml (HisTrap HP® 1ml - GE healthcare life Science) acoplada à um sistema de purificação (ÄKTA Purifier 10 - GE healthcare life Science). O volume utilizado foi acima da capacidade da coluna. A substância eluente utilizada para

equilibrar a coluna foi o TAMPÃO B (Apendice H). O TAMPÃO C (Apendice H) foi utilizado para recuperar a proteína. Todos os materiais (produto da extração e tampões) foram filtrados com filtro a 0,22 $\mu$ .

A quantificação da proteína N purificada foi feita método do Bradford (Bradford, 1976, EUA). Soluções de albumina de soro bovino (BSA) foram preparadas de forma seriada nas diluições de 62,5, 125, 250, 500 e 1000 g/mL, com o objetivo de gerar uma curva padrão. Foram adicionados 10  $\mu$ L de cada solução de BSA a um volume de 200  $\mu$ L do reagente de Bradford + 790 $\mu$ L de água Milli-Q, na diluição 1:100. Para o branco da curva, foram preparados 200  $\mu$ L do reagente de Bradford e 800 $\mu$ L de água Milli-Q. Além desses, 10  $\mu$ L da solução com a proteína N\_AM\_Hanta foi preparada em diluição 1:100 com os reagentes de Bradford+água Milli-Q, para a quantificação proteica. As soluções foram incubadas por 5 min, a 28°C (temperatura ambiente). Logo após, absorvâncias das soluções foram lidas em espectrofômetro BioMate 3 (Thermo Electron Corporation) com filtro de 595 nm. A curva proteica padrão foi gerada pelos valores de densidade óptica de BSA, gerando também uma equação de reta com valor de  $R^2=0,95$ . O valor encontrado na aferição para a proteína N\_AM\_Hanta foi de 680 g/mL. Esse valor foi confirmado na quantificação por absorvância ultravioleta em 280nm (Nanodrop<sup>TM</sup> UV-vis espectrofotômetro).

A solução final sofreu diálise para redução da concentração da uréia, do Imidazol, e para modificação do pH. O material contendo a proteína de interesse foi acondicionado em tubo de diálise (Millipore®) e mantido por 8 horas nas soluções I, seguida por mais 8 horas na solução II (Apendice H), sob agitação. A proteína ficou solubilizada em uma solução semelhante a solução II. A solução II será utilizada como controle nos testes sorológicos que virão a seguir.

### ***Eficiência da proteína utilizando Western blot***

O teste de eficiência da proteína foi realizado pela técnica de *Western Blot*, utilizando como anticorpo primário o soro de um paciente positivo para IgG (cedido pelo Laboratório de Virologia FCFRP-USP) e o pool de soros negativos previamente testado. Para o teste foram utilizados a Proteína N extraída e o Tampão controle (Solução II). Um gel de Poliacrilamida - Dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12% foi preparado para utilização de 6 poços. Ao material a ser analisado (Solução com a proteína e Solução II - tabela 10) foi adicionado bromofenol na proporção de 1:1. Todo o material foi fervido a 100°C por 5 minutos. Um gel de poliacrilamida a 12% foi preparado para a realização de dois testes com 3 poços: cada um: o primeiro com a Proteína purificada e o segundo com o tampão usado na diálise final (Solução II – Tabela 12) e o terceiro com o Marcador (Pageruler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, EUA). Repetiu-se essa disposição das substâncias no segundo teste. Realizou-se a eletroforese a 200v (Iniciando com 25mA e aumentando para 50 mA) por aproximadamente 45 minutos.

A transferência do conteúdo da membrana de Poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) para a membrana de nitrocelulose foi feita por *Electroblotting* utilizando o sistema de Eletroforese Mini-Protean II (BioRad), em gelo, a 100 V por 120 minutos. Um sistema de transferência úmida foi montado (Gel ligado a membrana de nitrocelulose, entre 2 papéis filtro absorventes, e todos entre 2 espumas embebidas com um tampão de transferência). A membrana de nitrocelulose utilizada possuía porosidade de 0,45 µm. Ao final da corrida, a membrana foi dividida em duas partes. Manteve-se um teste por banda de membrana, conforme a disposição no gel (Proteína/solução II – apêndice H). As membranas foram encubadas por 12 horas em leite desnatado a 5% em PBS para o bloqueio. A seguir, o material foi lavado com PBS. As membranas foram encubadas com o anticorpo primário

(soro positivo e pool de soros negativos para IgG contra o Hantavírus) na diluição de 1:1000 em PBS por uma 45 min. O material foi lavado novamente com PBS e posteriormente encubado com anticorpo secundário (anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase, preparado em roedor - Pierce) por 45 minutos. Repetiu-se a lavagem e encubou-se as membranas em solução reveladora (5mg de DAB - 3,3',4,4' diaminobenzidine - ioRad; diluída em 10 ml de PBS e adicionado de 15 $\mu$ L Peróxido de Oxigênio ultrapuro).

### **2.3.3 Imunoensaio (ELISA) para detecção de anticorpos IgG**

O teste enzimático foi realizado como teste de triagem das amostras coletadas. Utilizou-se a placa para ELISA de 96 poços (Nunc™ MaxiSorp™ ELISA Plates). O antígeno e o tampão usados na sensibilização da placa foram diluídos em tampão Carbonato - Bicarbonato (pH 9,6) e a sensibilização *overnight*. Todas as soluções estão descritas no apêndice

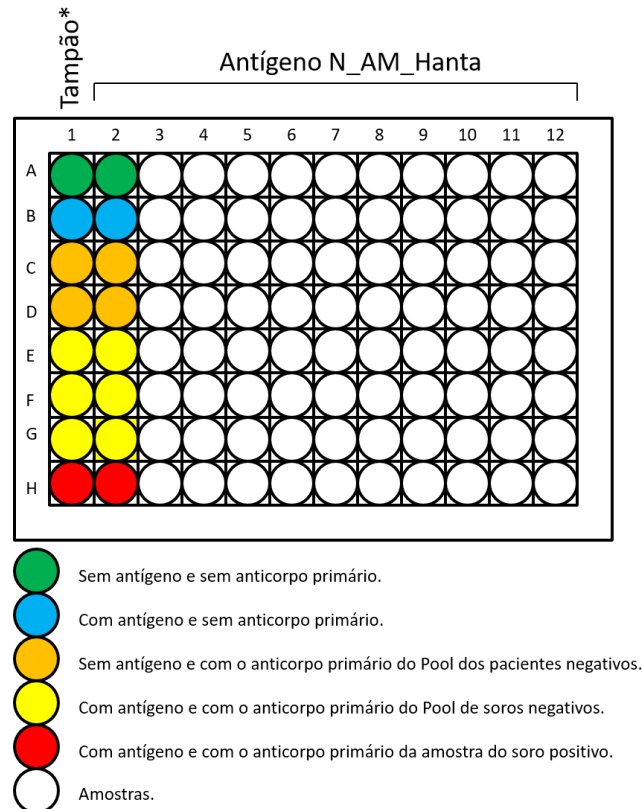
A padronização do ensaio ELISA para detecção de anticorpos IgG contra a proteína N recombinante iniciou-se com a avaliação da melhor solução de bloqueio, evitando-se ligações inespecíficas à placa. Foram realizados testes com diversas soluções: Soro fetal bovino a 5% em PBS; soro de cavalo a 5% em PBS; soro de albumina bovina a 1% em PBS e leite em pó desnatado a 1 e 10% em PBS. O leite em pó a 10%, mostrou-se mais adequada para uso no ELISA.

Para a otimização das concentrações e das diluições dos imunoreagentes, foi utilizada a técnica de “*checkerboard*”. Foram avaliadas diversas concentrações do antígeno (1, 2, 4, 6, 8  $\mu$ g/mL) e diluições seriadas das amostras positivas e negativas na razão 2 (1:50 até 1:1600). Decidiu-se utilizar o antígeno na concentração de 2  $\mu$ g/mL e os soros na diluição 1:100, por apresentarem resultados que melhor discriminam o positivo do negativo.

Após a padronização, na sensibilização das placas para o teste, utilizou-se o volume de 50 $\mu$ L (100ng) do antígeno diluído em tampão Carbonato – Bicarbonato (pH 9,6). O tampão (Solução II) foi diluído na mesma proporção do volume que a solução contendo a proteína. As placas para sensibilização permaneceram 16 horas a 4°C.

A amostra negativa foi preparada com um pool de amostra de 5 pessoas negativas para o Hantavírus. A diluição em PBS-T utilizada foi de 1:100 e multiplicada por 5 (nº de amostras). A amostra positiva para IgG contra o Hantavírus foi diluída em 1:100 em PBS-T. A função e como foram preparadas as placas estão descritas a seguir e esquematizadas na figura 8: As colunas 1 e 2 foram utilizadas como controles do teste e como componentes para o cálculo do *Cut-Off*. Na coluna 1, para a sensibilização, utilizou-se o tampão da diálise (solução II). Na coluna 2, utilizou-se a solução com a proteína N\_AM\_Hanta. Nas colunas de controle (1 e 2) a linha A (verde) não foi sensibilizada com tampão ou com antígeno e nem foi exposto ao anticorpo primário, Essa linha funcionou como controle interno do teste. A linha B (azul) foi sensibilizada com tampão e antígeno, mas não foi exposta ao anticorpo primário, também serviu como controle interno do teste. As linhas C e D das colunas 1 e 2 não foram sensibilizadas com tampão ou antígeno, mas foram expostas ao anticorpo primário do pool dos pacientes, e também serviram como controle interno do teste. As linhas E, F e G das colunas 1 e 2 foram sensibilizadas com o tampão e a com a proteína e foram expostas ao anticorpo primário do pool dos pacientes. A linha H das colunas 1 e 2 foi sensibilizada com o tampão e a proteína e os poços foram expostos ao soro do paciente positivo para IgG contra Hantavírus como anticorpo primário. Os demais poços nas demais colunas (3 a 12) foram sensibilizados com a proteína e utilizados para testar as amostras do estudo. O esquema da montagem da placa para o teste está exposto na figura 7. O anticorpo secundário utilizado foi imunoglobulina caprina anti-IgG humano, específico para cadeia  $\gamma$ , conjugada com peroxidase (ThermoFisher Scientific). O TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) foi usado

como substrato para o Horseradish peroxidase e a reação foi interrompida com ácido sulfúrico (3M). A leitura da absorbância da placa foi lida em 450nm na leitora de placa multitecnológica CHAMELEON™ V. Todo o protocolo para o teste está descrito no Apêndice I.



**Figura 7. Disposição da placa de 96 poços para ELISA, com os controles do teste. \* O tampão foi utilizado no lugar do antígeno na primeira coluna da placa.**

O cálculo do *Cut-Off* seguiu uma sequência de ações. Primeiro, calculou-se a média da absorbância dos poços E, F e G da coluna 1 (amarelo). Este valor era subtraído de todos os valores de absorbância da placa para redução das interferências no teste. Com os novos valores, foi calculada a média e o desvio padrão dos controles negativos (coluna 2 linhas E, F e G). A fórmula do *Cut-Off* é a média dos controles negativos + 3 x o desvio padrão (CO=

Média+3x DP). Amostras acima do valor de *Cut-Off* eram consideradas positivas. Amostras acima do valor da média do pool dos negativos eram consideradas indeterminadas.

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

Resultado ELISA


Amostra positiva > <i>Cut-off</i>
<i>Cut-off</i> > Amostra indeterminada > Média de 

Figura 8. Fórmula para o cálculo do *Cut-off*.

#### 2.3.4. Teste confirmatório utilizando a técnica de *Dot Blot*.

O teste confirmatório testou as amostras positivas e intermediária. Utilizou-se a técnica de *Dot Blot*. Tiras de membrana de nitrocelulose foram cortadas na dimensão de 1x1 cm e uma das pontas foi retirada para marcação, representando o ponto de maior concentração. Em dois pontos foram colocados 230 ng e 10 ng de proteína conforme a figura 9.

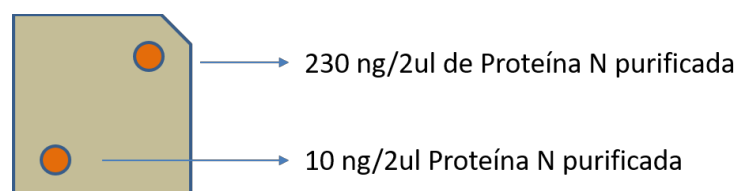


Figura 9. Esquema das diferentes concentrações da proteína no papel de nitrocelulose.

As tiras foram depositadas em poços de placa de 24. Nas placas, um poço foi utilizado como controle positivo e o outro com controles do pool dos negativos. Os demais poços foram utilizados para a análise confirmatória das amostras positivas. Os poços com as tiras foram bloqueados com leite desnatado a 10% por 2 horas. A seguir, os poços foram lavados com PBS-T. Logo após, foram encubados com soro do paciente por 45 minutos na diluição de 1:2000. Nos controles, foram utilizados a amostra positiva para IgG (positivo) e amostras negativas. Lavou-se o poço com solução PBS-T e adicionou-se o anticorpo secundário marcado (Mouse anti human IgG – Horseradixe peroxidase – Immunopure® - Pierce) na diluição 1:1000 por 45 minutos. Repetiu-se a lavagem e o produto final foi encubado com a solução reveladora (5mg de DAB - 3,3',4,4' diaminobenzidine – BioRad; diluída em 10 ml de PBS e adicionado de 15µL Peróxido de oxigênio ultrapuro).

Os resultados esperados no teste constam na figura 10:



**Figura 10. Tipos de respostas do teste de *Dot Blot* para detecção de soros positivos para IgG contra a Proteína N\_AM\_Hanta.**

Considerou-se positiva a amostra que se apresentava positiva ou indeterminada no teste de ELISA e que reagia nas duas concentrações no teste *Dot Blot* ou somente na maior



concentração. As amostras que não se enquadraram nessas características foram consideradas negativas.

### 3. APRESENTAÇÃO, ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

#### 3.1. RESULTADOS

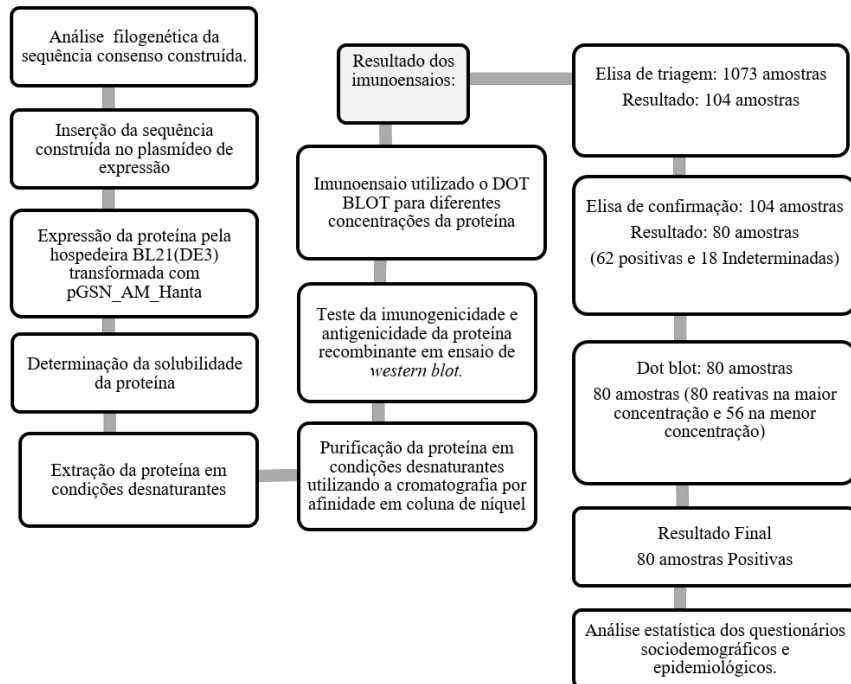
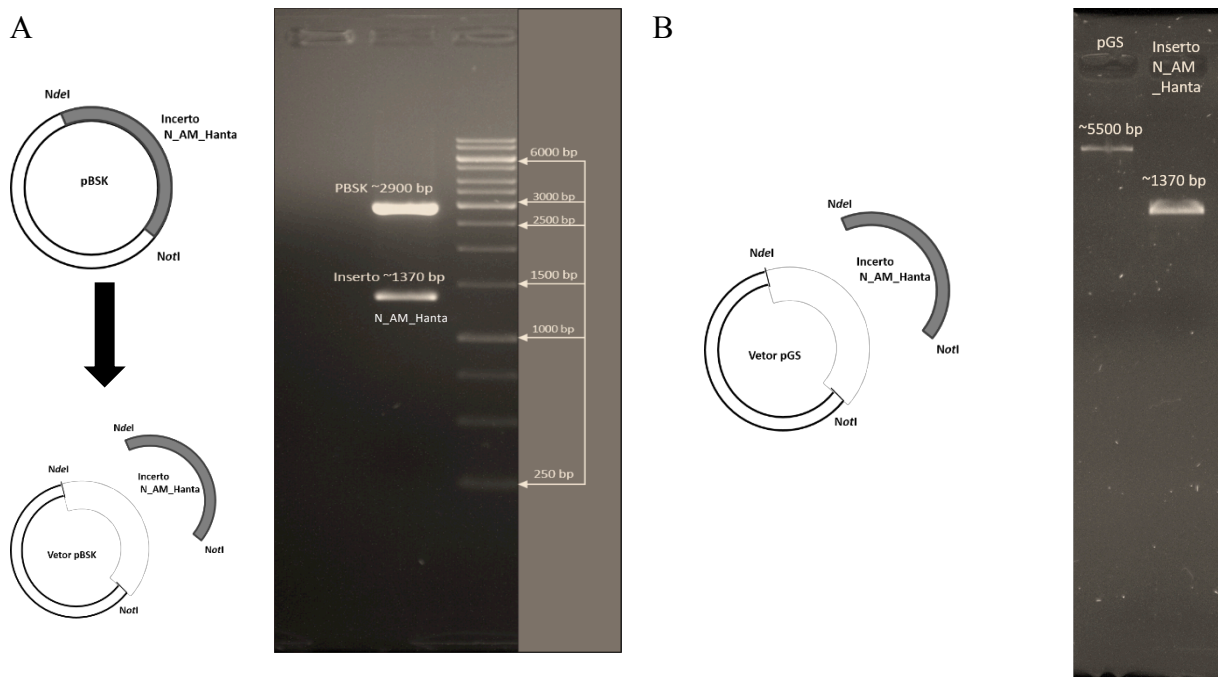


Figura 11. Fluxograma dos resultados

#### 3.1.3 Ligação dos fragmentos de interesse

A preparação do plasmídeo de expressão iniciou-se com a digestão analítica do pBSKN\_AM\_Hanta com NdeI e NotI que liberou o inserto de tamanho compatível com o tamanho da sequência sintetizada (1370 bp) (figura 14 A). Um gel de maior volume foi repetido para a separação das bandas e a retirada do material de interesse com o auxílio de um

estilete. Esse material foi purificado e um novo gel com o plasmídeo de expressão (pGS21a modificado) linearizado e o inserto foi preparado para avaliação da pureza e da concentração das bandas (figura 14 B). Após, um sistema de ligação com um subsequente sistema de digestão foi realizado, e em gel, demonstrou-se que a ligação ocorreu de forma correta, com a formação de uma banda de tamanho compatível (6870 bp) (figura 15 A) e, na digestão, os sítios das enzimas de restrição estavam corretos, liberando bandas compatíveis com o tamanho do inserto (1370bp) e com o tamanho do plasmídeo (5500 bp) (figura 15 B). A seguir o desenho do plasmídeo pGSN\_AM\_Hanta (figura 16).



**Figura 12. A)** Esquema da digestão do plasmídeo PBSKN\_AM\_Hanta, com liberação do inserto N\_AM\_Hanta (~1370 pb), utilizando as enzimas de restrição NdeI e NotI e à direita do esquema o gel de separação das bandas; **B)** Esquema do vetor de expressão PGS modificado (5500 pb) e o inserto com a sequência consenso codificadora da proteína N do Hantavírus (1370 pb) a direita o gel após digestão, extração e purificação. As bandas migraram com boas concentrações.

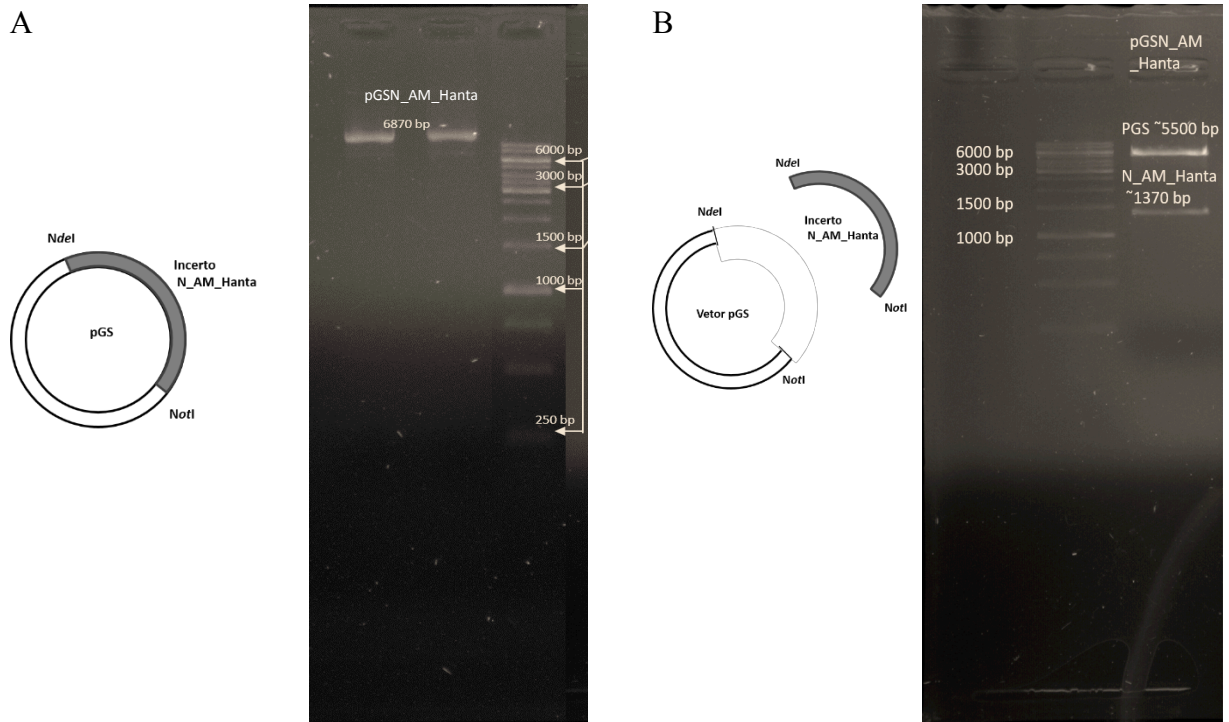


Figura 13. A) Esquema do plasmídeo de expressão com o inserto de interesse. Ao lado, o gel com o produto da ligação do plasmídeo pGS modificado com a sequência consenso que codifica a proteína N do Hantavírus; B) Esquema da digestão do pGSN\_AM\_Hanta, ao lado, a repetição de digestão com NdeI e NotI para confirmação de que o processo de ligação foi correto.

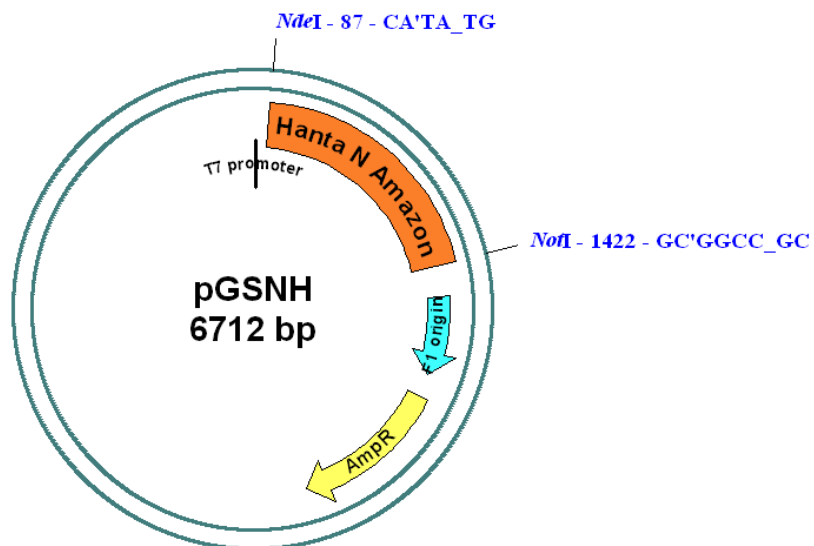
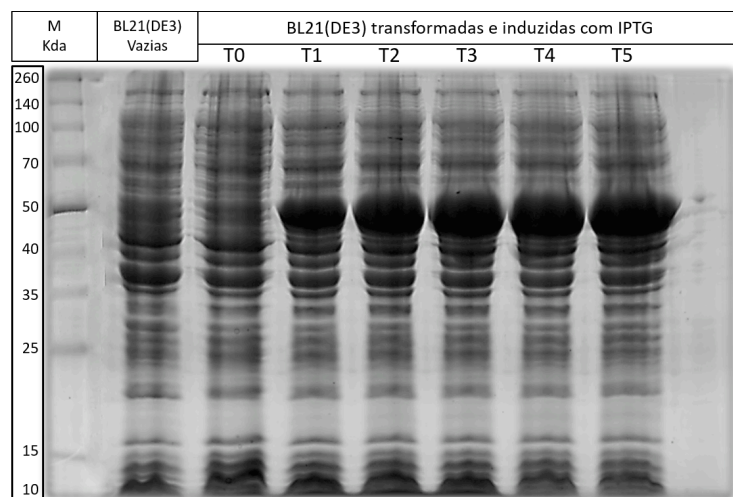


Figura 14. Desenho do plasmídeo pGSN\_AM\_Hanta após sistema de ligação.

### 3.1.4. Expressão do pGSN\_AM\_Hanta em E. Coli BL21(DE3)

A expressão da proteína pela hospedeira BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pGSN\_AM\_Hanta ocorreu de forma satisfatória. Na análise proteômica, é possível observar o aumento da expressão com a passagem do tempo, com um bom rendimento. O tamanho da proteína expressa é compatível com o tamanho da proteína N do Hantavírus (49Kda) (figura 17).

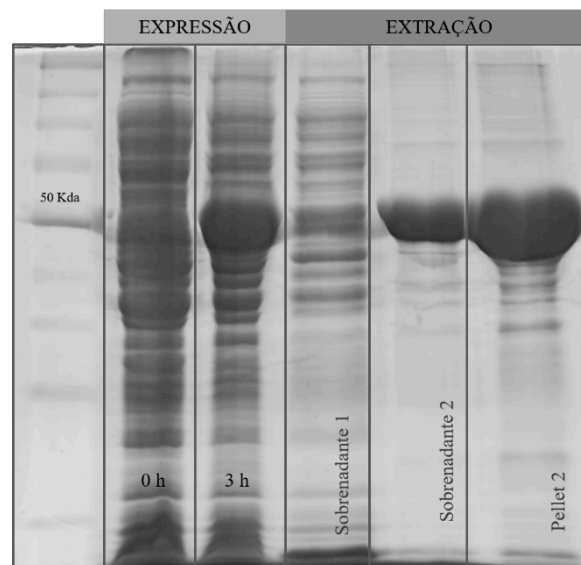


**Figura 15.** Gel de poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) a 12% com aliquotas coletadas durante o crescimento das bactérias E. Coli BL21DE com PGSN\_AM\_Hanta e induzidas com IPTG (0 a 5 horas). A expressão da proteína é visível e compatível com o tamanho da proteína N do Hantavirus (49 Kda). O marcador (M) utilizado foi Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder

### 3.1.5 Determinação da solubilidade da proteína N

Na fase de extração, verificou-se que a proteína estava na forma insolúvel e somente foi liberada em condições desnaturantes. É possível observar na figura 18 que a proteína não foi liberada para o sobrenadante com a análise das bactérias, se mantendo ligada ao Pellet 1. Em condições desnaturantes, com a concentração de ureia a 8M, observou-se a liberação da

proteína para o sobrenadante 2. Essa solução foi utilizada para a purificação da proteína. O Pellet 2 ainda apresentou grande quantidade de proteína não solubilizada. Com a repetição da extração em condições desnaturantes (em um tampão com ureia a 8M) essa proteína foi liberada (dado não demonstrado em gel).



**Figura 16. Demonstração do extrato total proteico da E. Coli BL21DE separado por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE, nas fases de expressão e de extração. Destaca-se o tamanho da proteína N\_AM\_Hanta durante as fases de expressão e nas fases de extração da proteína compatíveis com o tamanho de 49Kda. O marcador utilizado foi Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder.**

### **3.1.6. Purificação da fração insolúvel da Proteína N\_AM\_Hanta em condições desnaturantes.**

Para a purificação, utilizou-se o SOBRENADANTE 2 da fase de extração. A purificação da proteína por cromatografia de afinidade em um purificador comercial possibilitou a aferição, em uma curva de absorvância (linha azul na figura 19), do pico da liberação da proteína. Na figura, é possível observar a saída da proteína junto a outros

elementos em uma grande curva (1 ao 6), quando a concentração do Imidazol (competidor com a proteína na ligação ao metal níquel) ainda é baixa. O tampão B (sem Imidazol) ainda está sendo aplicado no sistema. O resultado demonstra que a capacidade de ligação da coluna foi excedida. Com a elevação da concentração do Imidazol (a partir do ponto 6), quando o tampão C começa a ser aplicado, vê-se um segundo pico (10 – 12), de menor intensidade, com a liberação de outras substâncias sem a presença da proteína de interesse. Com a elevação da concentração do Imidazol (Linha verde), observa-se um novo pico (13 a 18), momento em que a proteína é deslocada da coluna já purificada. As frações 13 a 18 foram unidas e a concentração final foi de 680µg/ml.

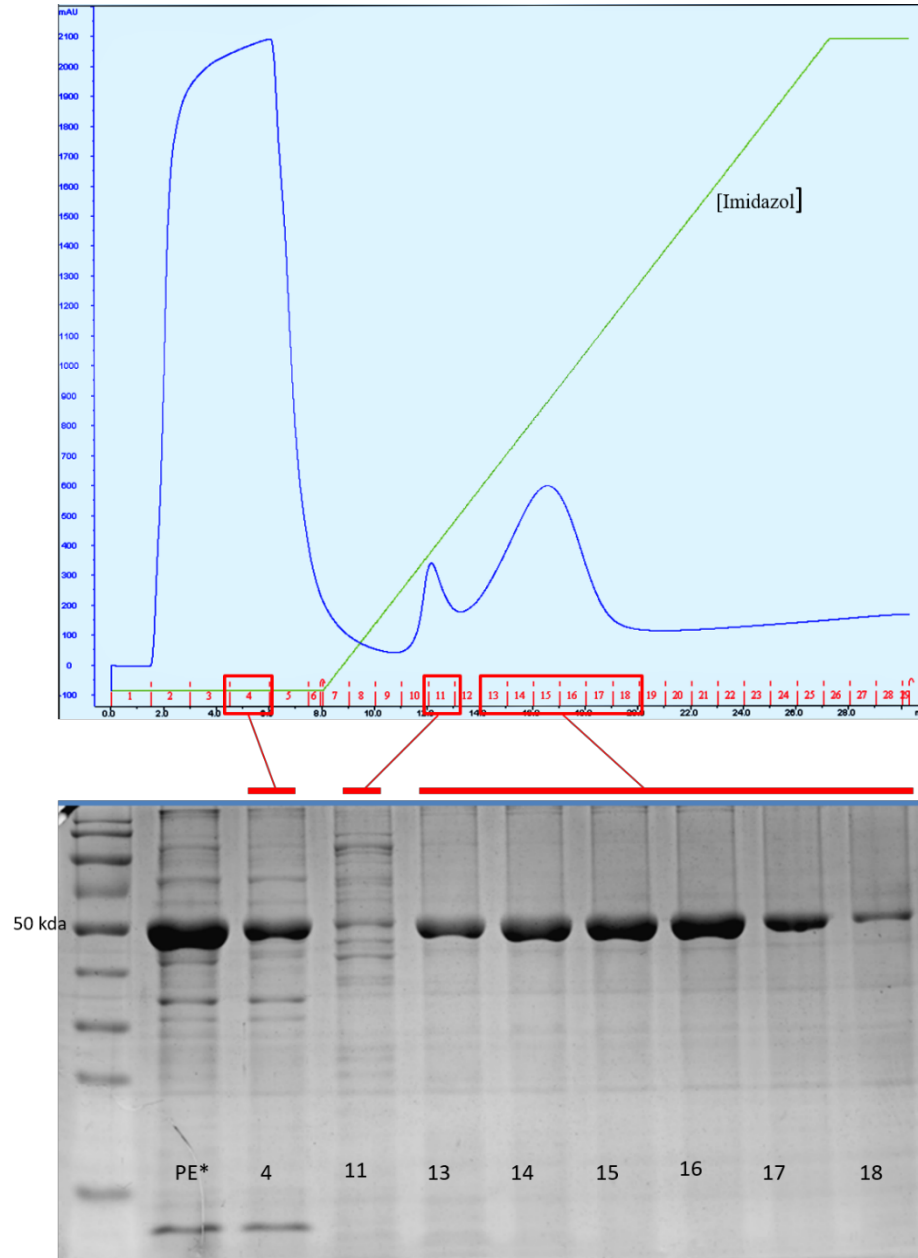


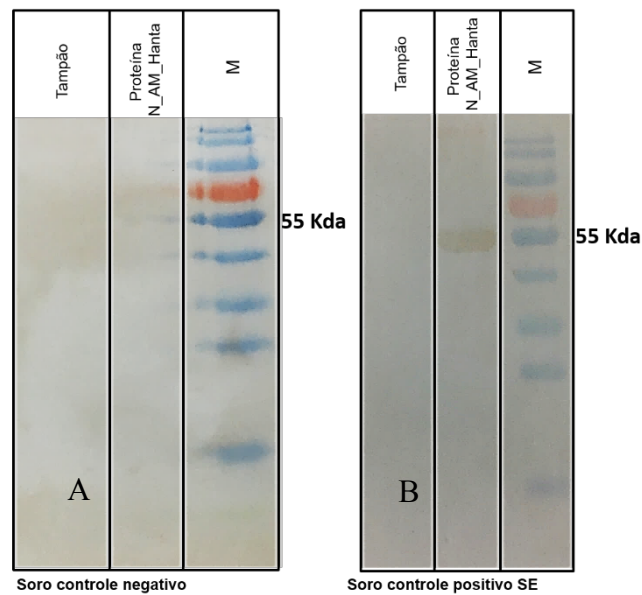
Figura 17. Curva de absorbância na fase de purificação com separação das substâncias presentes no produto da extração por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Destaque a saída da proteína na fase 4 junto com impurezas, seguida com a saída de outras substâncias na fase 11 e depois uma curva com a proteína purificada (13 a 17). O marcador utilizado foi Pageruler™ Prestained Protein Ladder. \*PE: Produto da Extração.

### 3.1.7. Teste da antigenicidade da proteína utilizando *Western blot*

A confirmação da capacidade de ligação da proteína ao anticorpo IgG contra o Hantavírus foi demonstrada no ensaio de *Western blot*. Utilizou-se uma amostra de paciente positivo para IgG contra o Hantavírus, oriunda da Região Sudeste, e testada previamente.



Outra amostra, o pool de indivíduos negativos, testada previamente para IgG contra o Hantavírus, foi utilizada como controle negativo. O tampão de diálise da proteína (Solução II – apêndice H), semelhante à solução onde está diluída a Proteína N, foi empregado como controle da reação do anticorpo IgG a outros componentes da solução. Na figura 20 A, é possível observar que não houve nenhuma reação no teste. Na figura 20B, observa-se uma reação na região compatível ao tamanho da proteína. Isso demonstrou a ligação de anticorpos IgG do paciente positivo para IgG contra o Hantavírus à proteína N\_AM\_Hanta (figura 20 B)



**Figura 18.** *Western Blot* utilizando a proteína N\_AM\_Hanta como antígeno. No gel, foram utilizados 2 testes com 2 poços cada: um com a proteína recombinante e ao lado, o tampão utilizado na diálise (mesma composição da solução onde está diluída a proteína). Após a transferência da proteína do gel para a membrana de nitrocelulose, dividiu-se em duas bandas: A) A Membrana A Foi encubada em solução de 1:1000 da amostra positiva para IgG da região SE contra o hantavírus como anticorpo primário; B) A membrana B foi encubada em solução com o Soro controle negativo diluído em 1:1000. A seguir, adicionou-se o anticorpo de roedor anti IgG humano marcado com peroxidase. A coloração foi feita com Peróxido de oxigênio e DAB que reagem com o

horseradish peroxidase gerando cor. A proteína foi marcada no tamanho correspondente (~49Kda) e reagiu com o soro positivo.

### 3.1.8. Ensaio da proteína utilizando *Dot Blot*

O ensaio de *Dot Blot* foi utilizado com diferentes concentrações da proteína, expostas à duas amostras positivas (uma da região Norte e Uma da região sudeste) e uma amostra negativa. No resultado, visualiza-se a reação da proteína N\_AM\_Hanta à anticorpos IgG. Na linha da amostra da Região Norte a reação ocorre intensa até o menor valor (0,39 ng). Na linha da amostra da Região Sudeste a reação ocorre intensa até a concentração 1,56 ng, diminuindo a intensidade em 0,78 ng e 0,39 ng. Não houve reação na amostra negativa (figura 21).

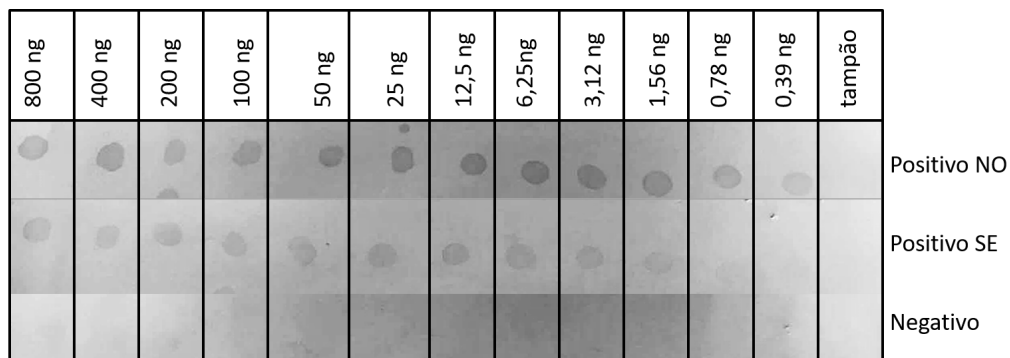


Figura 19. *Dot Blot* utilizando a proteína N\_AM\_Hanta do hantavírus em diversas concentrações frente a uma amostra positiva da região Norte (1ª Linha), uma amostra positiva da região Sudeste (2ª Linha) e uma amostra negativa (3ª Linha).

Ao repetir o teste com outras amostras negativas e com uma concentração maior de 920 ng, observou-se uma reação em todas as amostras utilizadas. A partir da linha de 460ng as amostras negativas não reagem mais (figura 22).

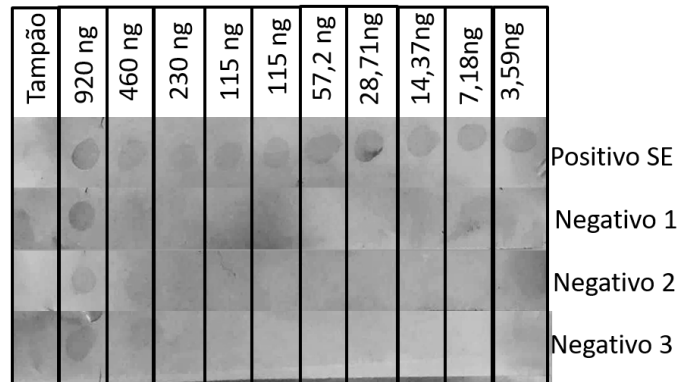


Figura 20. *Dot Blot* utilizando várias concentrações da Proteína N\_AM\_Hanta em contato com uma amostra de paciente positiva da região Sudeste (1ª Linha) e três amostras negativas do Amazonas (2ª, 3ª e 4ª Linha).

### 3.1.9. Resultado do teste enzimático (ELISA) para IgG e do *Dot Blot* contra a proteína N\_AM\_Hanta.

Foram analisadas 1073 amostras no teste ELISA de triagem, resultando em 104 amostras reagentes (positivas e indeterminadas). As amostras positivas e indeterminadas foram retestadas, finalizando-se com 62 amostras positivas e 18 amostras indeterminadas. Essas 80 amostras foram testadas no *Dot Blot* e todas as amostras reagiram na concentração de 230 ng e 56 reagiram na concentração de 10 ng. As 80 amostras foram consideradas positivas avaliando o resultado dos dois testes (Apêndice B).

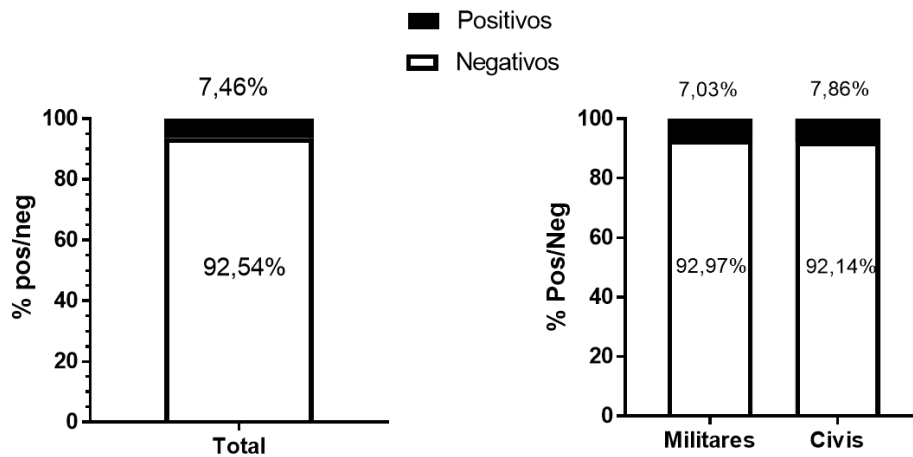
### **3.1.10. Resultado das análises estatísticas**

Os resultados dos testes sorológicos para determinação de IgG contra o Hantavírus foram analisados junto com as respostas dos questionários (apêndice E e F) respondidos pelos participantes do estudo. Foram utilizados dados sociodemográficos e dados sobre possíveis fatores de risco que compunham os questionários aplicados aos dois grupos pesquisados (civis e militares). Para análise estatística, avaliou-se: Dados da população geral (civis e militares – Positivos e negativos); Dados dos militares (positivos e negativos); Dados dos civis (positivos e negativos) e dados dos civis e militares (comparação entre os positivos)

***População Civil e militar (positivos e negativos)***

### *Dados de Prevalência.*

O estudo demonstrou a soroprevalência da hantavirose de 7,46% na população estudada de 1073 pessoas. Ao analisar os grupos (militar e civil) separadamente, encontrou-se a prevalência grupo civil de (7,86 %), seguida do grupo militar (7,03%) (figura 23).



**Figura 21.** Gráficos da prevalência de toda a população e dos grupos analisados. Toda população. Total: 1073 (100%); Positivos: 80 (7,46%); Negativos: 993 (92,54); Militares. Total: 526 (100%)/ Positivos: 37 (7,03%); Negativos: 489 (92,97%); Civis. Total: 547 (100%)/ Positivos:43 (7,86%)/ Negativos: 504 (92,14%).

### *Distribuição do local de moradia dos participantes*

A Tabela 6 demonstra a distribuição das cidades de residência dos Participantes (civis e militares), tendo em vista, que parte dos militares no momento da coleta estavam em Manaus (3 meses), sendo necessário observar onde estavam residindo antes de virem para a cidade:

Estado n (%)	Município	Militares		Civis	
		Negativos n(%)	Positivos n(%)	Negativos	Positivos
<b>AC</b> <b>Pos: 26</b> <b>(89,65%)</b>	Rio Branco	15(100)	0 (0%)		
	Cruzeiro do Sul	11 (78,57)	3 (21,43)		
<b>Neg: 3</b> <b>(10,35%)</b>					
<b>AM</b> <b>Neg: 260</b> <b>(91,22%)</b>  <b>Pos: 25</b> <b>(8,78%)</b>	Altazes	2 (100)	0 (0)		
	Anori	1 (100)	0 (0)		
	Barcelos	3 (75)	1 (25)		
	Boa Vista do Ramos	2 (100)	0 (0)		
	Borba	0 (0)	1 (100)		
	Caapiranga	1(100)	0 (0)		
	Careiro da Várzea	1(100)	0 (0)		
	Eirunepé	1 (100)	0 (0)		
	Humaitá	11 (100)	0 (0)		
	Irاندوبا	5 (100)	0 (0)		
	Itacoatiara	2 (100)	0 (0)		
	Manacapuru	3 (100)	0 (0)		
	Manaus	175 (89,75)	20 (10,25)	504 (92,14)	43(7,86)
	Maués	1 (100)	0 (0)		
	Novo Airão	2 (100)	0 (0)		
	Rio Preto da Eva	2 (66,67)	1 (33,33)		
	Santo Antônio do Iça	1 (100)	0 (0)		
	São Gabriel da Cachoeira	21 (100)	0 (0)		
	Tabatinga	17 (89,47)	2 (10,53)		
	Tefé	9 (100)	0 (0)		
<b>AP</b> <b>Pos: 15</b> <b>(93,75%)</b> <b>Neg: 1</b> <b>(6,25%)</b>	Macapá	11 (100)	0 (0)		
	Oiapoque	4 (80)	1 (20)		
<b>PA</b> <b>Pos: 49</b>	Altamira	6 (85,71)	1 (14,29)		
	Ananindeua	1 (100)	0		

<b>(94,23%)</b> <b>Neg: 3</b> <b>(5,77%)</b>	Belém	14 (93,33)	1 (6,67)		
	Itaituba	8 (100)	0 (0)		
	Marabá	19 (100)	0 (0)		
	Tucuruí	1 (50)	1 (50)		
<b>RO</b>	Guajará-Mirim	17 (100)	0 (0)		
	Porto Velho	4 (100)	0 (0)		
<b>RR</b> <b>Neg: 33</b> <b>(94,28%)</b> <b>Pos: 2</b> <b>(5,72%)</b>	Boa Vista	27 (93,10)	2 (6,90)		
	Bonfim	2 (100)	0 (0)		
	Pacaraima	2 (100)	0 (0)		
	Uiramutã	1 (100)	0 (0)		
<b>MT</b>	Alto alegre	1 (100)	0 (0)		
	Cárceres	2 (100)	0 (0)		
<b>MA</b>	Cuiabá	3 (100)	0 (0)		
	Imperatriz	5 (100)	0 (0)		
<b>TO</b>	São Luís	1 (100)	0 (0)		
	Dianópolis	1 (100)	0 (0)		
<b>MS</b>	Campo Grande	3 (100)	0 (0)		
	Coxim	1 (100)	0 (0)		
	Ladário	1 (100)	0 (0)		
<b>RJ</b> <b>Neg: 28</b> <b>(93,33%)</b> <b>Pos: 2</b> <b>(6,66%)</b>	Resende	27 (93,10)	2 (6,90)		
	Rio de Janeiro	1 (100)	0 (0)		
<b>PB</b>	João Pessoa	1 (100)	0 (0)		
<b>PE</b>	São João	1 (100)	0 (0)		
<b>RS</b>	Cidades do RS	2 (100)	0 (0)		
	Estrangeiros	12 (100)	0 (0)		
	Não responderam	23 (95,83)	1 (4,17)		
<b>Total Parcial</b>		489 (92,97)	37 (7,03)	504 (92,14)	43 (7,86)

Tabela 6. Distribuição dos participantes pelos municípios de origem.

Na figura 24 é demonstrada a distribuição da residência dos indivíduos que foram positivos nos imunoenaios por estado:

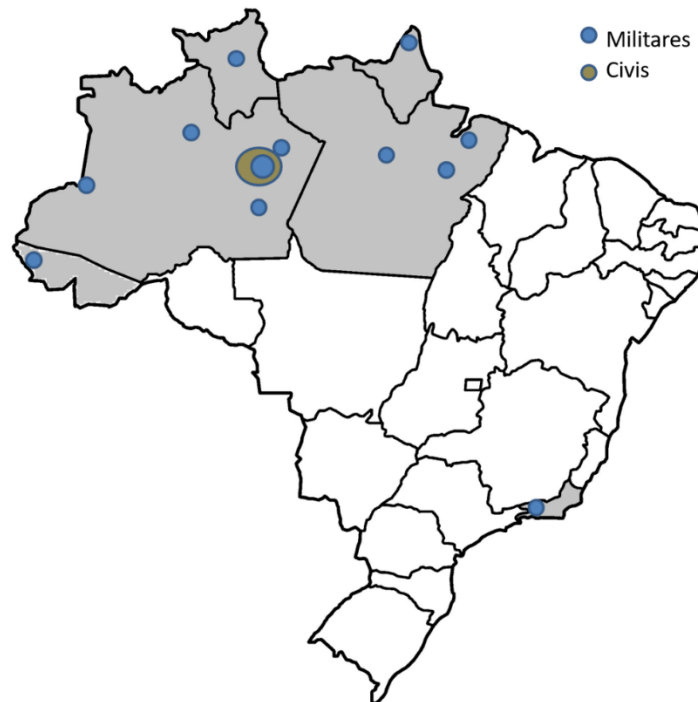


Figura 22. Local de residência dos participantes que foram positivos nos imunoenaios;

### *Fatores de risco para a população estudada (civis e militares)*

Os dados sociodemográficos e os fatores de risco colhidos nos questionários aplicados aos participantes do estudo foram analisadas pelo teste do  $\chi^2$  para as variáveis respostas, tendo como variável dependente ser ou não positivo no teste. Não foram observados resultados com significância no teste estatístico para os dados sociodemográficos (Apêndice C). Para os fatores de risco, matar ou capturar roedores foi um fator de risco significativo associado a ter o resultado positivo no teste para detecção de IgG contra a proteína N\_AM\_Hanta (Tabela 7 – figura 25).



Fator de risco	Sorologia		P valor*
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Já ouviu falar sobre hantavírus	311 (91,47)	29 (8,53)	0,469
Tem animais	641 (92,36)	53 (7,64)	0,718
Costuma visitar fazenda ou xácara	337 (94,93)	18 (5,07)	0,04**
Mora perto da floresta	272 (92,20)	23 (7,80)	0,610
Costuma tomar banho em locais abertos	309 (93,07)	23 (6,93)	0,784
Já participou de algum desmatamento	69 (95,45)	3 (4,55)	0,365
Mata ou captura roedores	106 (88,33)	14 (11,67)	0,03
Já matou roedores em casa	329 (92,68)	26 (7,32)	0,916
Já matou roedores na área de trabalho	102 (93,58)	7 (6,42)	0,469
Já foi mordido por roedores	65 (90,28)	7 (9,72)	0,622
Já comeu carne de roedores	75 (94,94)	4 (5,06)	0,385
Costuma caçar	46 (88,46)	6 (11,54)	0,238

Tabela 7. Dados epidemiológicos da população estudada. \* teste  $\chi^2$ . \*\* 8,49% dos positivos não costuma visitar a fazenda ou xácara.

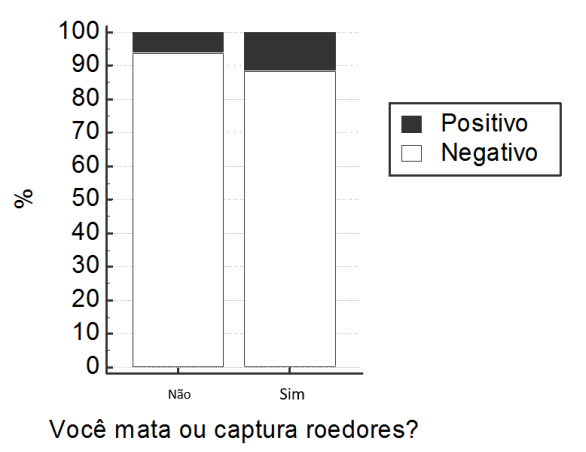


Figura 23. Na análise da população estudada, o fator "matar ou capturar roedores" está associado a positividade no teste sorológico para IgG contra a Proteína N do Hantavírus ( $p < 0,05$  Chi-Squared test; Razão de prevalência bruta: 1,82; IC95%: 1,04 a 3,18).

### *Militares (Positivos e Negativos)*

O grupo dos militares é composto apenas de homens. Possui militares em atividades diferentes e de origens diferentes, podendo ser divididos em dois grupos para análises: o primeiro é composto de militares alunos do Curso de Operações da Selva ( $n=341$ ), os quais

são sargentos ou oficiais de carreira e vindos de diversas cidades da Região Norte, inclusive Manaus. O outro é composto de soldados (n=171), na faixa etária de 18 anos, cumprindo serviço militar obrigatório, oriundos principalmente da cidade de Manaus. A prevalência do Hantavírus foi maior nos soldados (7,57%) seguida da dos alunos do COS (6,74%) (Tabela 8).

Sorologia	Militares		Total
	COS <sup>a</sup> n (%)	Soldados <sup>b</sup> n (%)	
Negativo	318 (93,26)	171 (92,43)	489 (92,97)
Positivo	23 (6,74)	14 (7,57)	37 (7,03)
<b>Total</b>	341 (100)	185(100)	526 (100)

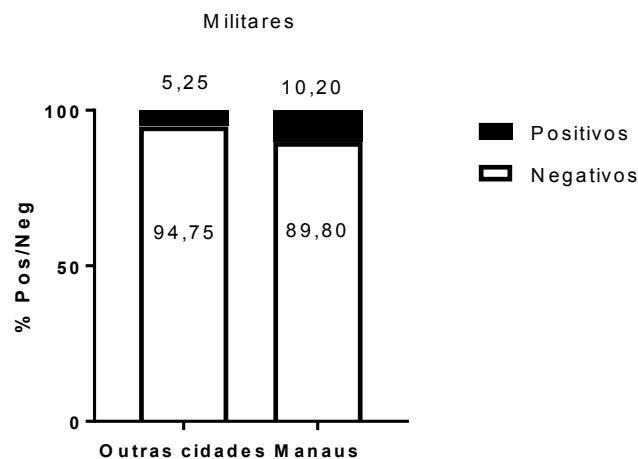
**Tabela 8. Características dos militares estudados: <sup>a</sup> Militares de carreira participantes do Curso de Operações na Selva; <sup>b</sup> Militares pertencentes ao serviço militar obrigatório.**

Dentre toda a população estudada (n=1073) (civis e militares), 742 indivíduos (69,15%), incluindo parte dos militares e todos os civis, residiam em Manaus no período da coleta. Os outros 307, todos militares (28,61%) estavam temporariamente na região no período do estudo (3 meses) (Tabela 9).

<u>Localidade de residência</u>	Negativos		Positivos	
	Militar	Civil	Militar	Civil
Outras cidades	289	-	16	-
	289 (94,76)		16 (5,24)	
Manaus	176*	504**	20*	43**
	680 (91,52)		63 (8,48)	
Não responderam	24	-	1	-
	24		1	

**Tabela 9.** Número de participantes que residiam em Manaus ou que eram de outras cidades e estavam passando um breve período em Manaus no período em que participaram do estudo. \*Militares de Manaus: Prevalência 10,20%. \*\*Civis de Manaus: Prevalência 7,86%

Diante desses dados, outra análise foi feita: Dos militares participantes do estudo (n=526), 25 não responderam onde estavam residindo e 501 militares responderam. Destes 501, 196 militares (39,12%) eram oriundos de Manaus e a prevalência neste grupo foi de 10,20% (p<0,05) (figura 25). Os outros 305 (60,88%) vieram de outras cidades, principalmente da Região Norte. A prevalência dos soropositivos nos militares de outras cidades foi de 5,25%. Esses militares moravam a pelo menos 6 meses nas cidades de origem.



**Figura 24.** Na análise do grupo dos militares, observando local onde residiam, verificou-se uma prevalência maior entre os militares que residem em Manaus comparado aos militares de

outras cidades ( $p < 0,05$  Chi-Squared test; Risco relativo: 1,05; IC95%: 1,00 a 1,12).

Os dados sociodemográficos e os fatores de risco colhidos nos questionários aplicados aos militares do estudo foram analisadas pelo teste do  $\chi^2$  para as variáveis respostas, tendo como variável dependente ser ou não positivo no teste. Não foram observados resultados com significância no teste estatístico para os dados sociodemográficos. Na variável faixa etária observa-se prevalência mais elevada na faixa etária de 30 a 39 anos (10,61%); na renda familiar, a prevalência é mais alta nos de faixa de renda mais baixa (8,7%) e diminui a prevalência com o aumento do poder aquisitivo na faixa de 4 salários mínimos. No entanto, a prevalência volta a aumentar (8,5%) entre os militares que recebem 5 ou mais salários mínimos; no item escolaridade, a faixa etária de 1ª a 4ª série do ensino fundamental apresenta a maior prevalência (14,28%); no item “a principal atividade nos últimos 12 meses”, as prevalências mais altas foram nos trabalhadores da prestação de serviços e comerciários (15,38%) e trabalhadores manuais da construção civil (14,29%). Para este item, ressalta-se que são os militares que cumprem serviço militar obrigatório. No item “quanto tempo mora na cidade”, a prevalência aumenta conforme aumenta o tempo em que o militar permanece na localidade. E no item “quando teve contato com a floresta”, os indivíduos que tiveram contato com a selva há mais de 1 ano apresentaram maior prevalência (11,43%) (Tabela 10).

Variáveis		Sorologia		P valor*
		Negativo	Positivo	
		n (%)	n (%)	
<b>1) Militares</b>	<b>Prevalência</b>	489 (92,97)	37 (7,03)	
<b>2) Faixa etária</b>	<b>&lt;20anos</b>	152 (92,68)	12(7,32)	0,723
	<b>20a29anos</b>	215(93,48)	15 (6,52)	
	<b>30a39anos</b>	59 (89,39)	7 (10,61)	
	<b>40a49anos</b>	20 (90,91)	2 (9,09)	

		<b>&gt;50anos</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
		<b>Total</b>	<b>446 (92,53)</b>	<b>36 (7,47)</b>	
<b>3)</b>	<b>Renda Familiar</b>	<b>1 SM</b>	63 (91,30)	6 (8,70)	0,768
		<b>2 SM</b>	77 (93,90)	5 (6,10)	
		<b>3 SM</b>	53 (94,64)	3 (5,36)	
		<b>4 SM</b>	61 (95,31)	3 (4,69)	
		<b>Mais de 5 SM</b>	181 (91,41)	17 (8,59)	
		<b>Total</b>	<b>435 (92,75)</b>	<b>34 (7,35)</b>	
<b>4)</b>	<b>Há quanto tempo você mora nesta área</b>	<b>&lt; 12 meses</b>	106 (92,17)	9 (7,83)	0,836
		<b>1 a 4 anos</b>	157(93,15)	11 (6,55)	
		<b>5 a 9 anos</b>	110 (91,67)	10 (8,33)	
		<b>10 - 19 Anos</b>	0 (0)	0 (0)	
		<b>20 - 29 Anos</b>	0 (0)	0 (0)	
		<b>30 - 39 Anos</b>	0 (0)	0 (0)	
		<b>40 a 59 anos</b>	0 (0)	0 (0)	
		<b>&gt; 50 anos</b>	0 (0)	0 (0)	
		<b>Total</b>	<b>373 (92,56)</b>	<b>30 (7,44)</b>	
<b>5)</b>	<b>Escolaridade</b>	<b>1ª a 4ª Série do ensino fundamental</b>	6 (85,71)	1(14,29)	0,267
		<b>5ª a 8ª Série do ensino fundamental</b>	6 (75)	2 (25)	
		<b>1ª a 3ª série do ensino médio</b>	67 (95,71)	3 (4,29)	
		<b>Ensino fundamental completo</b>	8 (80)	2 (20)	
		<b>Ensino médio completo</b>	154 (93,33)	11 (6,67)	
		<b>Superior incompleto</b>	75 (92,59)	6 (7,41)	
		<b>Superior completo</b>	128 (92,75)	10 (7,25)	
		<b>Total</b>	<b>444 (92,69)</b>	<b>35 (7,31)</b>	
<b>6)</b>	<b>Principal ocupação nos últimos 12 meses</b>	<b>Profissionais ou técnicos de nível médio</b>	4 (100)	0 (0)	0,761
		<b>Trabalhadores de serviços administrativos</b>	23 (92)	2 (8)	
		<b>Trabalhadores da prestação de serviços e comerciários</b>	18 (85,71)	3 (14,29)	
		<b>Trabalhadores de serviços domésticos</b>	14 (100)	0 (0)	
		<b>Trabalhadores agropecuários, florestais de caça e pesca</b>	5 (100)	0 (0)	
		<b>Trabalhador Manual (produção de bens e serviços industriais)</b>	5 (100)	0 (0)	
		<b>Trabalhadores manuais da construção civil</b>	11(84,62)	2 (15,38)	
		<b>Trabalhadores manuais de reparação e manutenção</b>	7 (100)	0 (0)	
		<b>Membros das forças armadas, policiais e bombeiros militares</b>	378 (93,10)	28 (6,90)	

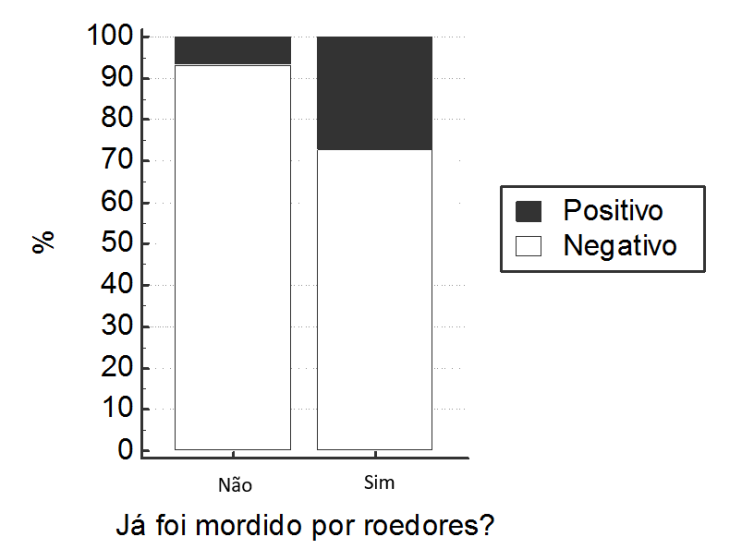
		<b>Ocupações mal especificadas do trabalho informal (ambulante, manobrista, guardador de carro...)</b>	24 (92,31)	2 (7,69)	
		<b>Total</b>	489 (92,97)	37 (7,03)	
7)	Teve contato com a floresta?	Não	96 (95,05)	4 (4,95)	0,326
		Sim	343 (92,20)	29 (7,80)	
		<b>Total</b>	439 (92,81)	34 (7,19)	
8)	Quando teve contato com a floresta	< 1 ano	288 (91,72)	26 (8,28)	0,193
		1 a 5 anos	31 (88,57)	4 (11,43)	
		<b>Total</b>	319 (91,40)	30 (8,60)	

Tabela 10. Dados sociodemográficos dos militares

Na análise dos fatores de risco, para todos os militares, ter sido mordido por roedores foi o item significativo e associado à positividade no teste sorológico (Tabela 11 – figura 27).

Variáveis	Sorologia		P valor*
	Negativo	Positivo	
	n (%)	n (%)	
Mora perto da floresta	154 (91,67)	14(8,33)	0,385
Costuma tomar banho em locais abertos	101 (92,66)	8 (7,34)	0,978
Trabalhou com agricultura	83 (91,21)	8 (8,79)	0,573
Participou de desmatamento na floresta	36 (92,31)	3 (7,69)	0,939
Mata ou captura roedores	27 (87,10)	4 (12,90)	0,216
Matou roedores em casa	128 (91,43)	12 (8,57)	0,505
Matou roedores na área de trabalho	59 (95,16)	3 (4,84)	0,414
Foi mordido por roedores	8 (78,73)	3 (27,27)	0,011
Comeu carne de roedores	42 (100)	0 (0)	0,055
Costuma caçar	30 (85,71)	5 (14,29)	0,111

Tabela 11. Dados epidemiológicos para militares. \* Teste de Chi-Squared.



**Figura 25.** Dentre os militares, ter sido mordido por roedores foi o fator de risco que teve relação com a positividade no teste para IgG ( $p=0,01$   $\chi$  CHI-squared test; Razão de prevalência bruta: 3,95; IC95%: 1,42 a 10,98).

### ***Civis (Positivos e Negativos)***

A população civil era toda da cidade de Manaus e vive na cidade há mais de um ano. No mapa de distribuição dos positivos do grupo dos civis por região administrativa da cidade de Manaus é possível observar uma prevalência maior nas zonas Centro Sul (11,86%) e Centro Oeste (9,38) e Oeste (8%) (Figura 28- tabela 12). Todos os valores estão acima da prevalência média da cidade (7,86%).

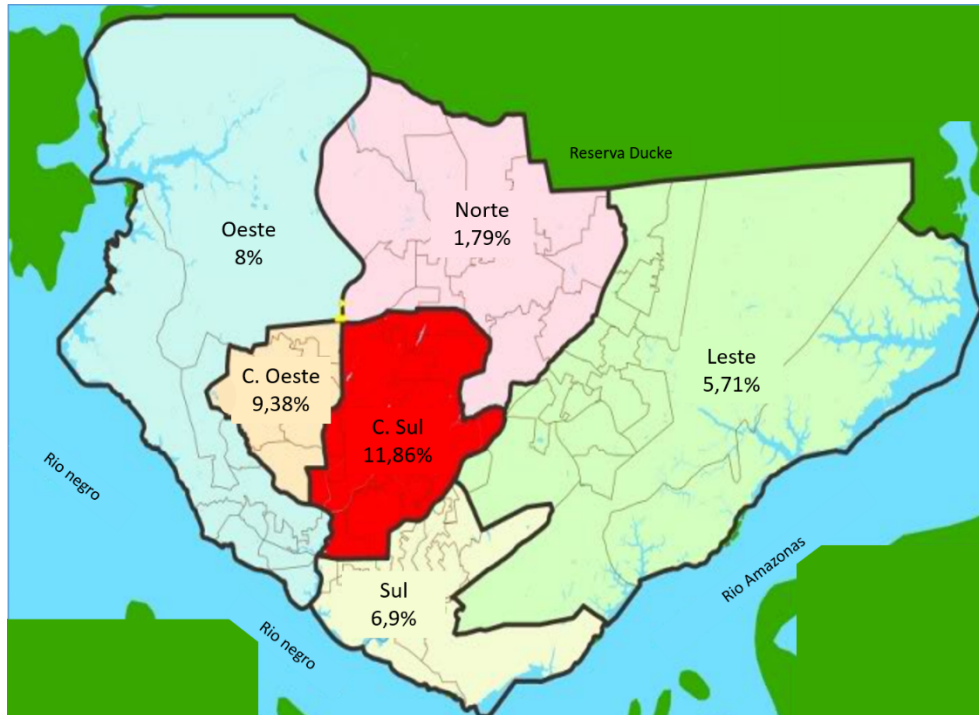


Figura 26. Mapa da distribuição das amostras positivas no grupo civil nas regiões administrativas da cidade de Manaus, com as respectivas prevalências.

	C.Oeste n (%)	C. Sul n (%)	Leste n (%)	Norte n (%)	Oeste n (%)	Sul n (%)	Total n (%)
<b>Negativo</b>	58 (90,63)	52 (88,14)	33 (94,29)	55 (98,21)	184 (92)	108 (93,1)	504 (92,14)
<b>Positivo</b>	6 (9,38)	7 (11,86)	2 (5,71)	1 (1,79)	16 (8)	8 (6,9)	43 (7,86)
<b>Total</b>	64 (100)	59 (100)	35(100)	56(100)	200(100)	116(100)	547(100)

Tabela 12. Distribuição dos Civis positivos e negativos na cidade de Manaus por zonas.

Toda a população do estudo com civis é composta por mulheres (n=393) e homens (n=154). A prevalência foi maior entre os homens (11,04%) comparado a prevalência das mulheres (6,62%), no entanto a significância foi limítrofe (p=0,08). Não houve significância associada aos dados sociodemográficos. Na variável “faixa etária” a prevalência aumenta conforme aumenta a idade, chegando a 12,5% na faixa etária acima de 50 anos; na “renda”, a faixa de 4 salários mínimo apresentou a prevalência de 10%; na “ocupação”, o destaque é



para Trabalhadores manuais (produção de bens e serviços industriais) (11,11%) e Profissionais ou técnicos de nível médio (13,64%); na variável “tempo em que vive na cidade”, a prevalência aumenta conforme aumenta o tempo em que vive na região. E no item “quando teve contato com a floresta”, os indivíduos que tiveram contato com a selva há mais de 1 ano apresentaram maior prevalência (Tabela 13).

	Variáveis	Sorologia		Valor p*
		Negativo	Positivo	
		n (%)	n (%)	
1) <u>Civis</u>		504 (92,14)	43 (7,86)	0.69
2) <u>Sexo</u>	<b>Feminino</b>	367 (93,38)	26 (6,62)	0,084
	<b>Masculino</b>	137 (88,96)	17(11,04)	
	<b>Total</b>	504 (92,14)	43 (7,86)	
3) <u>Faixa Etária</u>	<b>&lt;20anos</b>	37 (97,37)	1 (2,63)	0,078
	<b>20a29anos</b>	117 (93,60)	8 (6,40)	
	<b>30a39anos</b>	132 (95,65)	6 (4,35)	
	<b>40a49anos</b>	108 (90,0)	12 (10,0)	
	<b>&gt;50anos</b>	98 (87,50)	14 (12,50)	
	<b>Total</b>	492 (92,31)	41(7,69)	
4) <u>Renda Familiar</u>	<b>1 SM</b>	108 (93,10)	8 (6,90)	0.912
	<b>2 SM</b>	144 (93,51)	10 (6,49)	
	<b>3 SM</b>	95 (92,23)	8 (7,77)	
	<b>4 SM</b>	54 (90,0)	6 (10,0)	
	<b>Mais de 5 SM</b>	61 (93,85)	4 (6,15)	
	<b>Total</b>	462 (92,77)	36 (7,23)	

<b>5) <u>Principal ocupação nos últimos 12 meses</u></b>	<b>Desempregado</b>	133 (93,66)	9 (6,34)	0,893	
	<b>Trabalhadores manuais (produção de bens e serviços industriais)</b>	8 (88,89)	1 (11,11)		
	<b>Trabalhadores manuais da construção civil</b>	44 (95,65)	2 (4,35)		
	<b>Trabalhadores manuais de reparação e manutenção</b>	6 (100)	0 (0)		
	<b>Membros das forças armadas, policiais e bombeiros militares</b>	39 (92,86)	3 (7,14)		
	<b>Ocupações mal especificadas do trabalho informal (ambulante, manobrista, guardador de carro...)</b>	41 (91,11)	4 (8,89)		
	<b>Altos funcionários do governo, dirigentes, gerentes ou altos funcionários de empresa</b>	38 (90,48)	4 (9,52)		
	<b>Profissionais de nível superior</b>	33 (94,29)	2 (5,71)		
	<b>Profissionais das artes</b>	0 (0)	0 (0)		
	<b>Profissionais ou técnicos de nível médio</b>	19 (86,36)	3 (13,64)		
	<b>Trabalhadores de serviços administrativos</b>	3 (75)	1 (25)		
	<b>Trabalhadores da prestação de serviços e comerciários</b>	5 (100)	0 (0)		
	<b>Trabalhadores de serviços domésticos</b>	9(100)	0 (0)		
	<b>Trabalhadores agropecuários, florestais de caça e pesca</b>	38 (92,86)	3 (7,32)		
	<b>Total</b>	416 (92,86)	32 (7,14)		
	<b>6) <u>Escolaridade</u></b>	<b>Analfabeto</b>	6 (100)	0(0)	0,593
		<b>Alfabetizado</b>	4 (100)	0(0)	
		<b>1ª a 4ª Série do ensino fundamental</b>	8 (100)	0(0)	
		<b>5ª a 8ª Série do ensino fundamental</b>	30 (96,77)	1(3,23)	
		<b>1ª a 3ª série do ensino médio</b>	19 (95)	1(5)	
<b>Ensino fundamental completo</b>		30 (88,24)	4(11,76)		
<b>Ensino médio completo</b>		194 (89,81)	22(10,19)		
<b>Superior incompleto</b>		112 (94,12)	7(5,88)		
<b>Superior completo</b>		99 (94,29)	6(5,71)		
<b>Total</b>		502 (92,45)	41 (7,55)		

7) <b>Há quanto tempo mora nesta área</b>	<b>&lt; 12 meses</b>	0 (0)	0 (0)	0.912
	<b>1 a 4 anos</b>	86 (92,47)	7 (7,53)	
	<b>5 a 9 anos</b>	59 (92,19)	5 (7,81)	
	<b>10 - 19 Anos</b>	116 (92,80)	9 (7,20)	
	<b>20 - 29 Anos</b>	113 (93,39)	8 (6,61)	
	<b>30 - 39 Anos</b>	51 (91,07)	5 (8,93)	
	<b>40 a 59 anos</b>	37 (90,24)	4 (9,76)	
	<b>&gt; 50 anos</b>	9 (100)	0 (0)	
	<b>Total</b>	471 (92,53)	38 (7,47)	
8) <b>Você visitou ou teve contato com a floresta</b>	<b>Não</b>	270 (92,15)	23 (7,85)	0.807
	<b>Sim</b>	204 (92,73)	16 (7,27)	
	<b>Total</b>	474 (92,40)	39 (7,60)	
9) <b>Quando teve contato com a floresta</b>	<b>&lt; 1 ano</b>	115 (95,04)	6 (4,96)	0,193
	<b>1 a 5 anos</b>	21 (87,50)	3 (12,5)	
	<b>&gt; 5 anos</b>	19 (86,36)	3 (13,64)	
	<b>Total</b>	155 (92,81)	12 (7,19)	

Tabela 13. Dados sociodemográficos dos civis.

Não houve significância associada aos fatores de risco, no entanto, o fator de risco matar e capturar roedores teve associação limítrofe com a positividade no teste (Tabela 14).

Variáveis	Sorologia		P valor
	Negativo	Positivo	
	n (%)	n (%)	
<b>Tem animais</b>	504 (92,14)	43 (7,86)	1
<b>Já ouviu falar sobre hantavírus</b>	141 (91,46)	13 (8,44)	0,903
<b>Costuma visitar fazenda ou xácara</b>	167 (94,89)	9 (5,11)	0,164
<b>Mora perto da floresta</b>	118 (92,91)	9 (7,09)	0,899
<b>Costuma tomar banho em locais abertos</b>	208 (93,27)	15 (6,73)	0,709
<b>Trabalhou com agricultura.</b>	66 (92,96)	5 (7,04)	0,952
<b>Já participou de algum desmatamento na floresta</b>	27 (100)	0 (0)	0,133
<b>Mata ou captura roedores</b>	79 (88,76)	10 (11,24)	0,064
<b>Matou algum roedor em casa</b>	201 (93,49)	14 (6,51)	0,665
<b>Matou algum roedor na área de trabalho.</b>	43 (91,49)	4 (8,51)	0,778
<b>Foi mordido por roedores</b>	57 (93,44)	4 (6,56)	0,716
<b>Já comeu carne de roedores</b>	33 (89,19)	4 (10,81)	0,455
<b>Costuma caçar</b>	16 (94,12)	1 (5,88)	0,821

Tabela 14. Dados epidemiológicos para civis. \* Teste de  $\chi^2$ .**Análise comparativa entre civis e militares positivos**

A comparação entre os positivos dos dois grupos apresentou significância em alguns fatores. Foram 43 civis positivos e 37 militares positivos durante o estudo. Houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ) na idade dos civis positivos comparado aos militares positivos. Observou-se um maior número de jovens entre os militares positivos e um maior número de indivíduos mais velhos entre os civis positivos, fazendo a curva contrária à dos civis (Figura 29). Com relação ao tempo que mora na localidade, militares moram há menos tempo na região.

O número de positivos civis com renda baixa foi maior comparado aos militares, que apresentaram maior número de positivos em indivíduos de maior renda (figura 30). Contato com a floresta foi maior entre os militares positivos (85,3%) comparado aos civis positivos 59% ( $p > 0,001$ ). E o contato ocorreu há menos de 1 ano.

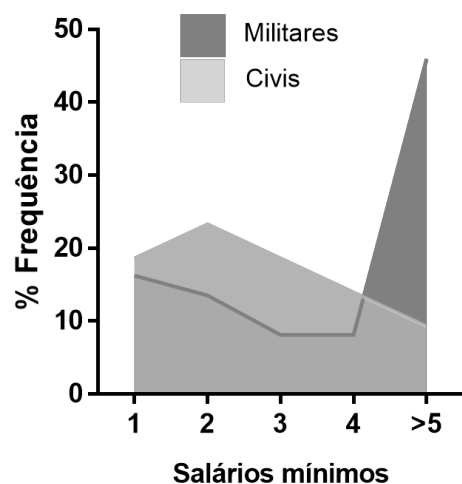
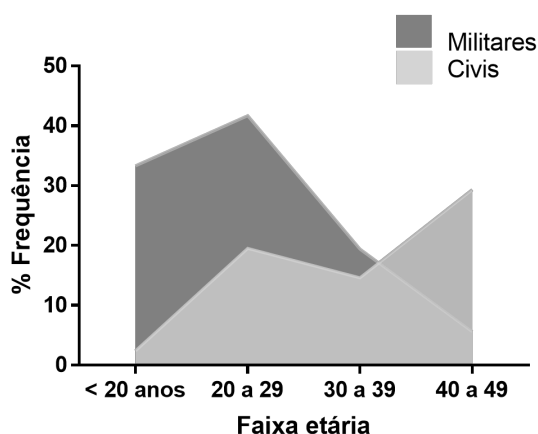


Figura 27. Gráfico demonstrando a análise comparativa das faixas etárias entre os positivos dos grupos Militar e Civil. No grupo Militar existe uma concentração de positivos dentro da faixa etária de 20 a 29 anos e uma diminuição com o aumento da idade. No grupo Civil a concentração de positivos é maior dentro das idades mais

Figura 28. Faixa de renda utilizando o salário mínimo como base: 1) até 1 salário mínimo; 2) 2 salários mínimos; 3) 3 salários mínimos; 4) 4 salários mínimos; 5) 5 ou mais salários mínimos

avançadas (30 a 49 anos), com uma tendência de elevação conforme a idade se eleva ( $p < 0,001$ ).

Variáveis		Civis	Militares	P value	Test stat.
		n = 43 (%)	n = 37 (%)		
<b>1) Faixa etária</b>	<20anos	1 (2.4)	12 (33.3)	< 0.001	Chisq. (4 df) = 32.47
	20a29anos	8 (19.5)	15 (41.7)		
	30a39anos	6 (14.6)	7 (19.4)		
	40a49anos	12 (29.3)	2 (5.6)		
	>50anos	14 (34.1)	0 (0)		
<b>2) Sexo</b>	Feminino	26 (60.5)	0 (0)	< 0.001	Chisq. (1 df) = 30.44
	Masculino	17 (39.5)	37 (100)		
<b>3) Município</b>	Altamira	0 (0)	1 (2.8)	< 0.001	Fisher's exact test
	Barcelos	0 (0)	1 (2.8)		
	Belém	0 (0)	1 (2.8)		
	Boa Vista	0 (0)	2 (5.6)		
	Borba	0 (0)	1 (2.8)		
	Cruzeiro do Sul	0 (0)	3 (8.3)		
	Manaus	43 (100)	20 (55.6)		
	Oiapoque	0 (0)	1 (2.8)		
	Resende	0 (0)	2 (5.6)		
	Rio Preto da Eva	0 (0)	1 (2.8)		
	Tabatinga	0 (0)	2 (5.6)		
	Tucuruí	0 (0)	1 (2.8)		
<b>4) Quanto tempo mora na localidade</b>	< 12 meses	0 (0)	9 (30)	< 0.001	Fisher's exact test
	1 a 4 anos	7 (18.4)	11 (36.7)		
	5 a 9 anos	5 (13.2)	10 (33.3)		
	10 - 19 Anos	9 (23.7)	0 (0)		
	20 - 29 Anos	8 (21.1)	0 (0)		
	30 - 39 Anos	5 (13.2)	0 (0)		
	40 a 59 anos	4 (10.5)	0 (0)		
	> 50 anos	0	0		
<b>5) Renda Familiar</b>	1 SM	8 (22.2)	6 (17.6)	0.01	Chisq. (4 df) = 13.23
	2 SM	10 (27.8)	5 (14.7)		
	3 SM	8 (22.2)	3 (8.8)		

	4 SM	6 (16.7)	3 (8.8)		
	Mais de 5 SM	4 (11.1)	17 (50)		
<b>6) Escolaridade</b>	Analfabeto	0	0	0.272	Fisher's exact test
	Alfabetizado	0	0		
	1ª a 4ª Série do ensino fundamental	0 (0)	1 (2.9)		
	5ª a 8ª Série do ensino fundamental	1 (2.4)	2 (5.7)		
	1ª a 3ª série do ensino médio	1 (2.4)	3 (8.6)		
	Ensino fundamental completo	4 (9.8)	2 (5.7)		
	Ensino médio completo	22 (53.7)	11 (31.4)		
	Superior incompleto	7 (17.1)	6 (17.1)		
	Superior completo	6 (14.6)	10 (28.6)		
<b>7) Visitou ou teve contato com áreas florestadas</b>	Não	23 (59)	5 (14.7)	< 0.001	Chisq. (1 df) = 13.24
	Sim	16 (41)	29 (85.3)		
<b>8) Último contato com Áreas florestadas</b>	< 1 ano	6 (50)	26 (86.7)	0.008	Fisher's exact test
	1 a 5 anos	3 (25)	4 (13.3)		
	< 5 anos	3 (25)	0 (0)		

Tabela 15. Dados sociodemográficos dos positivos.

Variáveis	Civis	Militares	P value	Test stat.
		n = 43 (%)	n = 37 (%)	
Possui animais	37 (100)	16 (45.7)	< 0.001	Chisq. (1 df) = 24.56
Costuma visitar fazenda ou xácara	9 (23.7)	9 (26.5)	1	Chisq. (1 df) = 0
Mora perto de áreas florestadas	9 (24.3)	14 (42.4)	0.176	Chisq. (1 df) = 1.83
Costuma tomar banho em locais abertos	15 (40.5)	8 (23.5)	0.202	Chisq. (1 df) = 1.63
Você já trabalhou com agricultura	5 (13.5)	8 (22.9)	0.469	Chisq. (1 df) = 0.52
Participação em desmatamentos	0 (0)	3 (8.6)	0.11	Fisher's exact test
Mata ou captura roedores	10 (30.3)	4 (11.4)	0.104	Chisq. (1 df) = 2.64
Já matou roedores em casa	14 (38.9)	12 (34.3)	0.876	Chisq. (1 df) = 0.02
Já matou roedores no trabalho	4 (11.1)	3 (8.6)	1	Fisher's exact test
Já foi mordido por roedores	4 (10.3)	3 (8.6)	1	Fisher's exact test
Já comeu carne de roedores	4 (10.3)	0 (0)	0.117	Fisher's exact test
Costuma caçar	1 (2.7)	5 (14.3)	0.102	Fisher's exact test

Tabela 16. Dados epidemiológicos entre positivos e negativos.

### 3.1. DISCUSSÃO

A região Amazônica, que cobre vários países da América do Sul, possui registro de casos da Síndrome Cardiopulmonar e de estudos de soroprevalência para a Hantavirose que demonstram a circulação do vírus (DE BARROS LOPES *et al.*, 2014; MONTOYA-RUIZ, DIAZ & RODAS, 2014; FIRTH *et al.*, 2012; GIMAQUE *et al.*, 2012; SANDOVAL *et al.*, 2010; DOS SANTOS *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 1992). No entanto, esses dados incipientes, referentes a uma região de grande extensão, ainda não esclarecem completamente quais os genótipos do vírus estão circulantes, sua ecologia, reservatórios, taxa de mortalidade, taxa de morbidade e área de circulação. A região possui grandes áreas de florestas preservadas e representa um grande anecúmeno, tendo em vista a dificuldade em sua ocupação. Isso aumenta a preocupação com a possibilidade da emergência de surtos onde a ocupação humana tem avançado, sendo necessários mais estudos para monitoramento. A esse fato, soma-se a preocupação com outras febre hemorrágicas, também prevalentes na Região Amazônica, e que precisam de rápido diagnóstico diferencial e intervenção ( FIRTH *et al.*, 2012; FIGUEIREDO, 2006).

Devido à falta de conhecimento sobre todos os genótipos circulantes, a estratégia utilizada, no presente estudo, foi de construir uma sequência consenso homologa às sequências da proteína N dos vírus que já foram identificados na Região Amazônica, e assim possibilitar reações cruzadas em teste de imunoensaio, aumentando as chances de detecção de indivíduos que já tiveram contato com o Hantavírus. Essa ideia de reação cruzada em imunoensaios é corroborada por MATTAR, GUZMÁN & FIGUEIREDO (2015); LEDERER

*et al.* (2013); KOMA *et al.* (2010); SCHMIDT *et al.* (2005); LINDKVIST *et al.* (2008); ELGH *et al.* (1998). As reações cruzadas são interessantes no testes ELISA, por exemplo, não só para o diagnóstico como também para os trabalhos de soroprevalência em locais sem histórico de casos ou com poucos registros (MATTAR; GUZMÁN; FIGUEIREDO, 2015). Essa reatividade é maior entre os genótipos mais próximos dentro da árvore filogenética e é mais forte entre os genótipos que ocorrem em uma mesma família de reservatório do vírus (Sigmondontinae, Neotominae, Arvicolinae e Murinae) (LEDERER *et al.*, 2013).

ELGH *et al.* (1998) demonstraram em seu estudo que existe um gradiente de resposta entre as ligações antígeno - anticorpo específicas a uma determinada espécie de vírus (homólogas) e as ligações não específicas (Heterólogas). Esta última representando a ligação cruzada. A intensidade da resposta é maior nas reações homólogas e mais fraca nas heterólogas. WITKOWSKI *et al.*, (2015) demonstraram como essa diferença pode influenciar um resultado. Em uma investigação sorológica na República do Congo os autores substituíram o antígeno, o vírus Sangassou, para o vírus Puumala em um teste ELISA de triagem. A relação positivo/negativo se alterou de 229/982 para 28/982 respectivamente. A vantagem, portanto, no uso da sequência consenso é o uso de um antígeno mais próximo dos vírus circulantes na Amazônia, para o uso em diagnóstico de casos ou em estudos de soroprevalência, aproximando os resultados da realidade e reduzindo falsos negativos ou subestimação de prevalências. No entanto, caso existam genótipos distantes infectando a população, teremos reações heterólogas e provavelmente os resultados serão as subnotificações e os menores resultados prevalência. É necessária a vigilância constante para a identificação de novos genótipos e a adequação do modelo para a identificação de casos de Hantavírus.

O presente estudo, realizado na região da capital do estado do Amazonas, Manaus, apresentou uma soroprevalência de 7,46%, em área urbana. Este dado reforça a ideia da



circulação do Hantavírus no estado do Amazonas, como já demonstraram publicações anteriores nas cidades de Itacoatiara, Careiro da várzea, Maués e Manaus ( FIRTH *et al.*, 2012; GIMAQUE *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2010 TEIXEIRA *et al.*, 2006; DOS SANTOS *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 1992).

Os estudos de soroprevalência na região norte do Brasil mostram uma média de 4,39% (0,6 – 13,6) (ALVES MORAIS *et al.*, 2016; PESSOA VIEIRA *et al.*, 2016; FIGUEIREDO *et al.*, 2014; MONTOYA-RUIZ, DIAZ & RODAS, 2014; PINTO JUNIOR, *et al.*, 2014; GIMAQUE *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2001). No estado do Amazonas, no único estudo de soroprevalência, realizado por GIMAQUE *et al.* (2012), a média dos resultados encontrados foi de 0,6% (0,2 – 0,9). O resultado de prevalência encontrado, no presente estudo, de 7,46% é alto, comparados aos dados descritos acima. E praticamente se iguala a média dos dados de soroprevalência em outros estados, principalmente da região sul e sudeste, onde a taxa de morbidade e mortalidade são maiores. A prevalência desses locais varia de 1,6 a 14% (média de 7,8%) (ALVES MORAIS *et al.*, 2016; PESSOA VIEIRA *et al.*, 2016; FIGUEIREDO *et al.*, 2014; MONTOYA-RUIZ, DIAZ & RODAS, 2014; PINTO JUNIOR, *et al.*, 2014; MEDEIROS *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2001). Notasse, que existe uma grande variação dos resultados encontrados nos estudos de soroprevalência. Isso pode ter relação com os antígenos utilizados para os testes sorológicos e a variação das espécies de hantavírus encontradas nas diversas regiões brasileiras.

Os dados gerados por GIMAQUE *et al.* (2012) são discrepantes comparados ao presente estudo. O referido estudo utilizou como antígeno uma proteína recombinante de ARAV que na análise filogenética está mais distante do clado ANDV. Esse pode ser o fator de diferença para o presente estudo, que utilizou uma proteína de maior similaridade com as

espécies do clado ANDV. A diferença entre os antígenos pode ser o fator que interfere na discrepância entre os resultados de prevalência dos estudos

No entanto, apesar dos valores serem altos (7,46%), a Região Norte possui o menor registro de casos da doença (BRASIL, 2016a, 2016b). A este fato pode-se atribuir duas possibilidades: A circulação de vírus apatogênicos ou a dificuldade na identificação dos casos. Portanto podem estar ocorrendo subnotificações dos casos. Essa ideia é corroborada por FIGUEIREDO *et al.* (2014). O Autor salienta que os casos graves podem ser a “ponta do iceberg” e que os indivíduos assintomáticos ou com febres inespecíficas podem não estar sendo identificados.

A prevalência encontrada em área urbana, foi outro achado importante do estudo, Pois o ciclo de transmissão, de forma geral, envolve contato com áreas silvestres ou atividades que proporcionem o contato com roedores silvestres (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014). No presente estudo, o grupo civil, composto de 547 indivíduos, apresentou a maior soroprevalência (7,86%). Este grupo, tem indivíduos de todas as regiões administrativas da cidade Manaus, onde as maiores soroprevalências foram registradas nas Regiões Centro Sul (11,86%), C. Oeste (9,38%) e Oeste (8%). Esses valores altos são semelhantes aos dados de soroprevalência em área urbana de PESSOA VIEIRA *et al.* (2016) (13,6%), em Sinop, no Mato Grosso, que também é área amazônica. Manaus está localizada em uma região com floresta preservada no entorno e com fragmentos de selva dentro da cidade, o que possibilita o contato da população com roedores silvestres, conhecidos por serem os principais reservatórios do vírus. Não se pode descartar, no entanto, a possibilidade de roedores sinantrópicos serem os reservatórios do vírus, como o que ocorre com o *Rattus norvegicus* e o Hantavírus Seoul (CHEN *et al.*, 1986; HIMSWORTH *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014) A região Centro Sul possui grande áreas de fragmentos florestais urbanos como o Parque do Mindú, os fragmentos de floresta no INPA e da UFAM. SOLORIO (2015) relata a

identificação de 4 primatas (*Saguinus Bicolor*) positivos para hantavírus oriundos dos fragmentos de floresta urbana do Mindú, INPA, Cidade Nova e SESI. Estes animais podem estar ocupando os mesmos espaços dos reservatórios de Hantavírus na Cidade e nesse caso funcionaram como sentinelas para a doença. Os fragmentos do Mindú e do INPA estão localizados na região Centro Sul. E o fragmento do SESI, apesar de estar localizado na Zona Leste, está interligado com o fragmento do Mindú (SOLORIO, 2015).

O fator de risco associado a positividade no teste sorológico foi a prática de matar e capturar roedores. Pode ser que o contato direto com o roedor e a proximidade seja um fator ligado a alta soroprevalência.

Ao analisar os dados sociodemográficos do grupo civil, na prevalência entre as faixas etárias, observa-se elevação da prevalência com o aumento da idade, corroborando com dados de estudos de soroprevalência em áreas endêmicas. Esta elevação pode estar associada ao tempo de exposição acumulada ao longo da vida (BERGSTEDT OSCARSSON *et al.*, 2016; PESSOA VIEIRA *et al.*, 2016; MUÑOZ-ZANZI *et al.*, 2015).

O grupo militar tem um papel sentinela no estudo. O grupo apresentou uma prevalência de 7,03%, um valor considerado alto (acima da média para a região Norte de 4,39%), tendo em vista que os militares são considerados como grupo de risco para o contato com o vírus, segundo o manual do Ministério da Saúde sobre Hantavirose (BRASIL, 2014). Esse valor de soroprevalência é alto comparado aos dados de soroprevalência em militares em outros países (CLEMENT *et al.*, 1996; NEWMAN *et al.*, 2014). Analisado o grupo quanto a natureza da atividade, demonstra-se uma pequena variação nos valores de prevalência. Nos alunos do Curso de Operações na Selva (COS), que são militares de carreira, o valor de prevalência foi de 6,74%, enquanto os militares pertencentes ao serviço militar obrigatório (soldados) apresentaram a soroprevalência de 7,57%. Os militares do COS vêm de diversas

regiões do Brasil e ficam pouco anos na Região Norte não sendo possível afirmar que o contato com o vírus foi na região amazônica. Já os soldados, são naturais da região, principalmente de Manaus e cidades próximas, o que reforça a ideia de o vírus ser prevalente na região de Manaus.

Um fato, no entanto, merece atenção na análise dos dados. Ao separar os militares pelo local de domicílio no momento do estudo, verificou-se que a prevalência dos militares que residem em Manaus foi de 10,20% e que a prevalência dos militares servindo em outras cidades foi de 5,25% ( $p < 0,05\%$ ). Este dado é um indício de que a prevalência do Hantavírus na região de Manaus possa ser alta principalmente em atividades profissionais consideradas de risco, como é o caso dos militares. O tempo exposição pode interferir nesses valores. Na avaliação “a quanto tempo mora na área”, observa-se um aumento na prevalência nos indivíduos que permanecem residindo por 5 a 9 anos.

Áreas de conflito ou áreas para exercícios que imitam situações de conflitos colocam os militares em contato com o habitat de roedores silvestres, que podem transmitir o hantavírus como já identificado em alguns estudos (NEWMAN *et al.*, 2014; RIVAS *et al.*, 2003; PON *et al.*, 1990; CLEMENT *et al.*, 1996). Os militares que atuam na Região Amazônica são expostos a treinamentos e manobras militares em áreas de selva Amazônica. Na região de Manaus, as áreas de treinamento militar são no entorno da cidade. Principalmente na estrada AM 010 que liga Manaus à Itacoatiara. E é na cidade de Itacoatiara que estão alguns dos poucos registros de casos com morte no estado do Amazonas (DOS SANTOS *et al.*, 2006). Isso tudo, reitera o papel sentinela que esses indivíduos podem exercer em sinalizar a presença de doenças emergentes que podem afetar a população. E a principal característica da atividade militar, na região norte, é o contato com áreas florestadas. Este dado é bem marcado entre os militares (85,3%), podendo ter relação com um comportamento de risco ligado a profissão.

Outro ponto importante é a saúde dos militares. São necessárias mais investigações sobre a interferência da Hantavirose em atividades militares. Estes indivíduos participam de treinamentos extenuantes, ficando mais susceptíveis ao desenvolvimento de síndromes graves, como a rabdomiólise. A presença de uma infecção viral associada pode agravar ainda mais o risco de morte.

O único fator de risco associado a positividade, neste grupo, foi ter sido mordido por roedores. Esse dado corrobora com outros estudos e com os fatores de risco descritos pelo Ministério da Saúde, de contato com os reservatórios (JONSSON; FIGUEIREDO; VAPALAHTI, 2010; BRASIL, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

Ao comparar os indivíduos positivos (43 civis e 37 militares) buscou-se observar as características dos dois grupos para verificar a existência de diferenças entre eles. A faixa etária apresentou diferenças marcantes. O número de positivos foi maior entre os indivíduos mais velhos no grupo civil e maior entre os militares mais jovens do grupo militar. O tempo de exposição ao vírus acumulado ao longo da vida pelos civis pode ser um fator explicador corroborando com BERGSTEDT OSCARSSON *et al.* (2016); PESSOA VIEIRA *et al.* (2016); MUÑOZ-ZANZI *et al.*, (2015). Já o grupo militar, fator explicador pode ser a atividade em áreas de selva. O ponto de interseção entre os grupos é na idade de 30 anos.

Reforça-se essa ideia de diferença entre militares e civis ao observar um grande número de positivos na faixa de renda maior (mais de 5 salários mínimos) entre os militares. Diversos trabalhos demonstram uma maior prevalência na população de menor renda, semelhante à curva de renda dos civis. (LEIBLER *et al.*, 2016; AYRAL *et al.*, 2015; ESTEVE-GASSENT *et al.*, 2014; KILPATRICK & RANDOLPH, 2012;). Isso mostra, que entre os militares, a atividade militar pode ser o fator preponderante no contato com o vírus, diferente da população civil, na qual os indivíduos de menor renda podem desenvolver

atividades que facilitem o contato com roedores, ou ainda que por serem de menor renda, morem em locais em que o contato com roedores seja mais intenso (HIMSWORTH *et al.*, 2014).

O estudo tem diversas limitações que devem ser consideradas na análise final do trabalho. Os testes sorológicos, apesar da presença dos controles internos, devem ser mais testados para certificar-se da inexistência de outros fatores interferentes. Para isso, eles devem ser validados para amostras positivas e negativas, além de testados com amostras positivas para outros vírus que ocorrem na Região Amazônica, e assim excluir cruzamentos nos testes. Na análise estatística, não foi possível analisar todos as perguntas para todos os participantes do estudo, por alguns questionários não terem sido preenchidos completamente. A coleta por conveniência, também, dificulta a uniformização dos dados coletados.

O estudo traz dados relevantes a respeito dessa zoonose emergente e é o primeiro estudo com militares no Brasil. Diante dos dados de prevalência, as autoridades de saúde e militares devem dar mais atenção ao monitoramento e aos esforços para melhor entendimento da dinâmica da Hantavirose na Região Amazônica. É necessário um método de diagnóstico diferencial da Hantavirose para outras doenças hemorrágicas da região que possuem sinais clínicos muito semelhantes. Os métodos utilizados no trabalho devem ser aprimorados para este fim, mas já se mostram adequados. Atividades consideradas de risco devem receber maior atenção com o monitoramento de possíveis casos graves. Esses grupos podem funcionar como sinalizadores da circulação do hantavírus. A atividade militar, se mostrou de risco para o contato com o vírus, e pode funcionar como sentinela para essa doença que possui ciclos silvestres e urbanos. Por fim, há a necessidade de desenvolvimento de métodos diagnósticos mais precisos para a realidade da Amazônia, utilizando como referência as espécies de Hantavírus já identificadas na região, como foi o resultado da proteína N\_AM\_Hanta.

A sequência consenso da proteína N foi expressada em bactérias *E. coli* e a proteína recombinante resultante foi utilizada em imunoenaios (ELISA e *DOT BLOT*) para estudo de soroprevalência para o Hantavírus. Foi observada uma prevalência elevada (7,46%) entre os participantes do estudo. Ao separar a análise entre os grupos participantes, observou-se uma prevalência alta (7,86%) em indivíduos de área urbana na cidade de Manaus. Entre os militares a prevalência também foi alta 7,03%, destacando-se a maior prevalência encontrada em militares residindo em Manaus (10,20%). Esses dados demonstram uma alta prevalência de Hantavirose no Município de Manaus.

## 4. CONCLUSÃO

Conclui-se que:

- 1) A Hantavirose é uma doença prevalente no município de Manaus;
- 2) A atividade militar é uma atividade de risco para o desenvolvimento de casos de Hantavirose e pode funcionar como atividade sentinela para monitoramento da Hantavirose;
- 3) Militares em Manaus estão sob maior risco tendo em vista o valor de prevalência detectado;
- 4) O contato direto com roedores pode ser a principal forma de transmissão do vírus;
- 5) A proteína N recombinante gerada de um matriz consenso dos principais vírus que ocorrem na região Amazônica se mostrou adequada para utilização em sistemas de diagnóstico que utilizam antígenos para a detecção de anticorpos;
- 6) A sequência consenso gerada tem maior semelhança com as sequências dos vírus do Clado ANDES vírus e pode ser a circulante na região;
- 7) A proteína N recombinante de 49 kDa reage adequadamente em testes de imunoensaio na presença de soros de pacientes positivos para Hantavírus.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES MORAIS, F. et al. Serological survey of hantavirus in inhabitants from tropical and subtropical areas of Brazil. **Advances in Virology**, v. 2016, 2016.
- ARAÚJO, D. et al. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo , Brazil Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo , Brazil. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.
- AYRAL, F. et al. The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats: a survey in Rhône, France (2010–2012). **Journal of Epidemiology and Infection**, v. 143, p. 586–599, 2015.
- BADRA, S. J. **ESTUDO SOROLÓGICO RETROSPECTIVO SOBRE A HANTAVIROSE NO MUNICÍPIO DE CÁSSIA DOS COQUEIROS , NO PERÍODO DE 1986 A 1991.** [s.l: s.n.].
- BERGSTEDT OSCARSSON, K. et al. Human Puumala hantavirus infection in northern Sweden; increased seroprevalence and association to risk and health factors. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 566, 2016.
- BRASIL. **Manual de Vigilância, prevenção e controle das hantavirose.** [s.l: s.n.].
- BRASIL. Casos confirmados de hantavirose no Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1993 a 2016. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2016a.
- BRASIL. Óbitos de Hantavirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1993 - 2016\*. **Secretaria de vigilância em Saúde, Ministério da Saúde**, 2016b.
- CHEN, H. X. et al. Epidemiological studies on hemorrhagic fever with renal syndrome in {China}. **J Infect Dis**, v. 154, n. 3, p. 394–398, 1986.
- CHOI, Y. et al. A hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome requires gC1qR/p32 for efficient cell binding and infection. **Virology**, v. 381, n. 2, p. 178–183, 2008.
- CLEMENT, J. et al. Hantavirus outbreak during military manoeuvres in Germany. **Lancet**, v. 347, p. 336, 1996.

- CLEMENT, J. et al. A unifying hypothesis and a single name for a complex globally emerging infection: Hantavirus disease. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 1–5, 2012.
- DE ARAUJO, J. et al. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. **BMC research notes**, v. 5, n. 1, p. 690, 2012.
- DE BARROS LOPES, L. et al. Rickettsia bellii, Rickettsia amblyommii, and Laguna Negra hantavirus in an Indian reserve in the Brazilian Amazon. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 191, 2014.
- DE OLIVEIRA, R. C. et al. Rio Mamoré Virus and Hantavirus Pulmonary. **Emerging Infections Diseases**, v. 20, n. 9, 2014.
- DE OLIVEIRA, S. V. et al. Potential geographic distribution of hantavirus reservoirs in Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–8, 2013.
- DEARING, M. D.; DIZNEY, L. Ecology of hantavirus in a changing world. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1195, p. 99–112, 2010.
- DE THOISY, B. et al. Short report: Maripa Hantavirus in French Guiana: Phylogenetic position and predicted spatial distribution of rodent hosts. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 6, p. 988–992, 2014.
- DOLBY, A. et al. Sero-epidemiological study of the presence of hantaviruses in domestic dogs and cats from Belgium. **Research in veterinary science**, v. 92, n. 2, p. 221–4, abr. 2012.
- DOS SANTOS, M. C. et al. Human hantavirus infection, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 7, p. 1165–7, jul. 2006.
- ELGH, F. et al. Development of humoral cross-reactivity to the nucleocapsid protein of heterologous hantaviruses in nephropathia epidemica. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 309–315, 1998.
- ELKHOURY, M. R. et al. **Boletim Eletrônico EpidemiológicoMS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde**. [s.l: s.n.].
- ENGELTHALER, D. M. et al. Climatic and environmental patterns associated with hantavirus pulmonary syndrome, Four Corners region, United States. **Emerging infectious diseases**, v. 5, n. 1, p. 87–94, 1999.

- ENGLER, O. et al. Seroprevalence of hantavirus infections in Switzerland in 2009: Difficulties in determining prevalence in a country with low endemicity. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 50, p. 1–9, 2013.
- ESTEVE-GASSENT, M. D. et al. Pathogenic Landscape of Transboundary Zoonotic Diseases in the Mexico-US Border Along the Rio Grande. **Frontiers in public health**, v. 2, n. November, p. 177, 2014.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil Viral hemorrhagic fevers in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 203–210, 2006.
- FIGUEIREDO, L. T. M. et al. Expression of a hantavirus N protein and its efficacy as antigen in immune assays. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 596–599, 2008.
- FIGUEIREDO, L. T. M. et al. Hantaviruses and cardiopulmonary syndrome in South America. **Virus research**, p. 1–12, 5 fev. 2014.
- FIGUEIREDO, G. G. DE et al. Diagnosis of hantavirus infection in humans and rodents in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 348–354, 2010.
- FIRTH, C. et al. Diversity and Distribution of Hantaviruses in South America. **Journal of Virology**, v. 86, n. 24, p. 13756–13766, 2012.
- GIMAQUE, J. B. L. et al. Serological evidence of hantavirus infection in rural and urban regions in the state of Amazonas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 135–7, fev. 2012.
- GUO, W. P. et al. Phylogeny and Origins of Hantaviruses Harbored by Bats, Insectivores, and Rodents. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 2, 2013.
- HEYMAN, P. et al. In search for factors that drive hantavirus epidemics. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. July, p. 1–23, 2012.
- HIMSWORTH, C. G. et al. The characteristics of wild rat (*Rattus* spp.) populations from an inner-city neighborhood with a focus on factors critical to the understanding of rat-associated zoonoses. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.
- HJELLE, B.; TORRES-PÉREZ, F. Hantaviruses in the Americas and their role as emerging

- pathogens. **Viruses**, v. 2, n. 12, p. 2559–2586, 2010.
- HU, X. Q. et al. Diversity and distribution of host animal species of hantavirus and risk to human health in jiuhua mountain area, china. **Biomedical and environmental sciences : BES**, v. 27, n. 11, p. 849–57, nov. 2014.
- JONSSON, C. B.; FIGUEIREDO, L. T. M.; VAPALAHTI, O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 412–41, abr. 2010.
- KALLIO, E. R. et al. Endemic hantavirus infection impairs the winter survival of its rodent host. **Ecology**, v. 88, n. 8, p. 1911–1916, 2007.
- KHAIBOULLINA, S. F.; MORZUNOV, S. P.; ST JEOR, S. C. Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis. **Current molecular medicine**, v. 5, n. 8, p. 773–790, 2005.
- KILPATRICK, A. M.; RANDOLPH, S. E. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. **The Lancet**, v. 380, n. 9857, p. 1946–1955, 2012.
- KOMA, T. et al. Truncated Hantavirus Nucleocapsid Proteins for Serotyping Sin Nombre , Andes , and Laguna Negra Hantavirus Infections in Humans and Rodents □. v. 48, n. 5, p. 1635–1642, 2010.
- KRAUTKRÄMER, E.; ZEIER, M. Hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome enters from the apical surface and requires decay-accelerating factor (DAF/CD55). **Journal of virology**, v. 82, n. 9, p. 4257–64, 2008.
- LARRIEU, E. et al. Seroprevalencia de hantavirus en roedores y casos humanos en el sur de la Argentina Hantavirus seroprevalence in rodents and human cases in. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 68–75, 2003.
- LEDERER, S. et al. Indirect Immunofluorescence Assay for the Simultaneous Detection of Antibodies against Clinically Important Old and New World Hantaviruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, 2013.
- LEIBLER, J. H. et al. Zoonotic and Vector-Borne Infections Among Urban Homeless and Marginalized People in the United States and Europe, 1990-2014. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 16, n. 7, p. 435–444, 2016.
- LEIGHTON, F. A.; ARTSOB, H. A. A Serological Survey of Rural Dogs and Cats on the Southwestern Canadian Prairie for Zoonotic Pathogens. **Canadian Journal of Public Health**, n. FEBRUARY, p. 67–71, 2001.

- MATHEUS, S. et al. New world hantavirus in humans, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1294–1295, 2006.
- MATTAR, S.; GUZMÁN, C.; FIGUEIREDO, L. T. Diagnosis of hantavirus infection in humans. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. July, p. 1–8, 2015.
- MEDEIROS, D. B. A et al. Circulation of hantaviruses in the influence area of the Cuiabá-Santarém Highway. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 5, p. 665–671, 2010.
- MILLS, J. N. et al. Long-Term Studies of Hantavirus Reservoir Populations in the Southwestern United States : Rationale , Potential , and Methods. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 95–101, 1999.
- MONTGOMERY, J. M. et al. Hantavirus pulmonary syndrome in Santa Cruz, Bolivia: outbreak investigation and antibody prevalence study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 10, p. e1840, jan. 2012.
- MONTOYA-RUIZ, C.; DIAZ, F. J.; RODAS, J. D. Recent evidence of hantavirus circulation in the american tropic. **Viruses**, v. 6, n. 3, p. 1274–93, jan. 2014.
- MUÑOZ-ZANZI, C. et al. Serological evidence of hantavirus infection in apparently healthy people from rural and slum communities in Southern Chile. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 2006–2013, 2015.
- NAVECA, F. G. et al. Complete Genome Sequence of a Dengue Virus Serotype 4 Strain Isolated in Guangdong, China. **Journal of Virology**, v. 86, n. 12, p. 7021–7022, 2012.
- NEWMAN, E. N. C. et al. Seroconversion for Infectious Pathogens among UK Military Personnel Deployed to Afghanistan . **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 12, p. 2008–2011, 2014.
- NICHOL, S. T. et al. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. **Science (New York, N.Y.)**, v. 262, n. 5135, p. 914–917, 1993.
- NISBETT, R. A. et al. Serologic Survey of Oklahoma Rodents : Evidence for the Presence of a Hantavirus and an Arenavirus. **Oklahoma Academy of Science**, v. 66, n. November, p. 53–66, 2001.
- OLIVEIRA, S. V. et al. Potential geographic distribution of hantavirus reservoirs in Brazil. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e85137, jan. 2013.

- OLIVEIRA, R. C. DE et al. Hantavirus Reservoirs: Current Status with an Emphasis on Data from Brazil. **Viruses**, p. 1929–1973, 2014.
- PESSOA VIEIRA, C. J. et al. Short Communication Serological evidence of hantavirus infection in an urban area in Mato Grosso State , Brazil. v. 49, n. 3, p. 348–350, 2016.
- PINTO JUNIOR, ET AL. Twenty years of hantavirus pulmonary syndrome in Brazil: a review of epidemiological and clinical aspects. **The Journal of Infection in Developing Countries**, p. 4–9, 2014.
- PON, E. et al. Outbreak of hemorrhagic fever with renal syndrome among U.S. Marines in Korea. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 6, p. 612–619, 1990.
- RAFTERY, M. J. et al. Release of Neutrophil Extracellular Traps. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 7, p. 1485–1497, 2014.
- RIVAS, Y. J. et al. The seroprevalences of anti-hantavirus IgG antibodies among selected Venezuelan populations. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 97, n. 1, p. 61–7, 2003.
- ROMANO-LIEBER, N. S.; YEE, J.; HJELLE, B. Serologic survey for hantavirus infections among wild animals in rural areas of Sao Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 43, n. 6, p. 325–327, 2001.
- ROSA, E. S. T. et al. Newly Recognized Hantaviruses Associated with Hantavirus Pulmonary Syndrome in Northern Brazil : Partial Genetic Characterization of Viruses and Serologic Implication of Likely Reservoirs. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 5, n. 1, 2005.
- SANDOVAL, A. E. et al. Serologic Survey of Hantavirus Infection , Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 889–891, 2010.
- SANTOS, JANDURY PEREIRA ; LAVOCAT, MARÍLIA NUNES; MACHADO, ROSÂNGELA ROSA; STEINKE, VALDIR ADILSON; STEINKE, E. T. A dinâmica do uso da terra e a hantavirose na amazônia legal-brasil dynamics of land use and hantavirus in the legal amazon-brazil. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 163, n. 15, p. 33–43, 2012.
- SCHMALJOHN, C. S.; NICHOL, S. T. **Hantaviruses**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001.

- SCHMIDT, J. et al. Development and evaluation of serological assays for detection of human hantavirus infections caused by Sin Nombre virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 33, n. 3, p. 247–253, 2005.
- SCOTCH, M.; ODOFIN, L.; RABINOWITZ, P. Linkages between animal and human health sentinel data. **BMC veterinary research**, v. 5, p. 15, 2009.
- SOLORIO, M. R. Levantamento de agentes infecciosos nas sub-populações de Sauim-de-coleira ( *Saguinus bicolor* ) na cidade de Manaus , Estado de Amazonas São Paulo. 2015.
- SOUZA, W. M. et al. Phylogeography and evolutionary history of rodent-borne hantaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 198–204, 2014.
- TEIXEIRA, K. DA G. et al. **Boletim Eletrônico EpidemiológicoMS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde**. [s.l: s.n.].
- 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 Amazônia through high prevalence of antibodies in residents of Manaus, Brazil. **Journal of Brazilian association for the advancement of science**, v. 44, p. 162–163, 1992.
- VASCONCELOS, P. F. et al. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica**, v. 17 Suppl, p. 155–164, 2001.
- WITKOWSKI, P. T. et al. Hantaviruses in Africa. **Virus Research**, v. 187, p. 34–42, 2014.
- WITKOWSKI, P. T. et al. Human seroprevalence indicating hantavirus infections in tropical rainforests of Cote d'Ivoire and Democratic Republic of Congo. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAY, p. 1–6, 2015.
- WÖHLKE, J. L. **Construção de vetores de expressão para Escherichia coli baseados em promotores ativos na fase estacionária de crescimento**. [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2012.
- YOSHIMATSU, K.; ARIKAWA, J. Serological diagnosis with recombinant N antigen for hantavirus infection. **Virus Research**, v. 187, p. 77–83, 2014a.

YOSHIMATSU, K.; ARIKAWA, J. Antigenic Properties of N Protein of Hantavirus. **Viruses**, v. 6, n. 8, p. 3097–3109, 13 jan. 2014b.

ZEIER, M. et al. New ecological aspects of hantavirus infection: a change of a paradigm and a challenge of prevention--a review. **Virus genes**, v. 30, n. 2, p. 157–80, mar. 2005.



## APÊNDICE D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

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

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

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

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

Caso você possua animais em sua casa (cães ou gatos), se você permitir, também serão coletados 5 mL do animal para pesquisar hantavirose, também nos animais. Os riscos relacionados com sua participação são a dor causada pela picada da agulha e um pequeno sangramento que pode acontecer após a coleta de sangue. O único benefício relacionado com a sua participação é o de nos ajudar a conhecer essa doença no seu município e as situações de risco para sua transmissão e assim evitar que novos casos aconteçam.

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

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

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

Não, a minha amostra não deverá ser armazenada.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

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



Assinatura alternativa  
(Impressão do dedo polegar)

## APÊNDICE E- Questionário aplicado aos proprietários de animais- CCZ



Universidade Federal do Amazonas (Faculdade de Ciências Farmacêuticas).

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

1. Endereço: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_
2. Bairro/ Comunidade: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_
3. Há quanto tempo você mora nesta área? \_\_\_\_\_
4. Idade: \_\_\_\_\_ Gênero/Sexo:  Masculino  Feminino
5. Qual seu Grupo Sanguíneo: \_\_\_\_\_ RH:  Positivo  Negativo
6. Qual o seu nível de escolaridade?
 

<input type="checkbox"/> Analfabeto	<input type="checkbox"/> Ensino fundamental completo
<input type="checkbox"/> Alfabetizado	<input type="checkbox"/> Ensino médio completo
<input type="checkbox"/> 1ª a 4ª série do ensino fundamental	<input type="checkbox"/> Superior incompleto
<input type="checkbox"/> 5ª a 8ª série do ensino fundamental	<input type="checkbox"/> Superior completo
<input type="checkbox"/> 1ª a 3ª série do ensino médio [3]	
7. Renda Familiar:  até 1 salário  2 salários  3 salários  4 salários  5 ou mais salários
8. Você trabalha?  Sim  Não
9. Nos últimos 12 meses, qual foi sua principal ocupação? [Entrevistador: com a ajuda do entrevistado, classifique a ocupação no grupo ocupacional mais adequado]
  - Não tinha. Estavas desempregado (a)
  - Altos funcionários do governo, dirigentes, gerentes ou altos funcionários de empresa
  - Profissionais de nível superior
  - Profissionais das artes
  - Profissionais ou técnicos de nível médio
  - Trabalhadores de serviços administrativos
  - Trabalhadores da prestação de serviços e comerciantes
  - Trabalhadores de serviços domésticos
  - Trabalhadores agropecuários, florestais de caça e pesca
  - Trabalhadores manuais (produção de bens e serviços industriais)
  - Trabalhadores manuais da construção civil
  - Trabalhadores manuais de reparação e manutenção

- Membros das forças armadas, policiais e bombeiros militares
- Ocupações mal especificadas do trabalho informal (ambulante, manobrista, guardador de carro...)
- \_\_\_\_\_
- 10. Você tem algum problema de saúde que lhe impede de trabalhar ou fazer exercícios?**  
 Sim  Não
- 11. Qual tamanho da sua família?**  1  2  3  4  5 ou +
- 12. Quantas crianças tem na sua casa?**  0  1  2  3  4 ou +
- 13. Faz uso de bebida alcoólica?**  Sim  Não se SIM, que frequência?  
 \_\_\_\_\_/semana
- 14. Você fuma?**  Sim  Não se SIM, que frequência?  
 \_\_\_\_\_/semana
- 15. Já esteve internado?**  Sim  Não  
 Se SIM, quantas vezes?  1  2-5  6-10  11 ou +  
 Qual especialidade?  Cardiologia  Oftalmologia  Neurologia  
 Infectologia  Pneumologia  Cirurgia  
 Angiologia  Nefrologia  Clínica da Dor  
 Outras: \_\_\_\_\_
- 16. Você é usuário do SUS?**  Sim  Não
- 17. Possui outra patologia?**  SIM  NÃO  
 Quais?  Hipertensão Arterial Sistêmica (Tratamento?  Sim /  Não)  Diabetes (Tratamento?  Sim /  Não)  
 Obesidade  Lúpus  Câncer  Outras: \_\_\_\_\_
- 18. Você tem sorologia positiva para algum vírus?**  Sim  Não  
 HIV  HTLV  HEPATITE (qual: \_\_\_\_\_)  Citomegalovírus  Outra: \_\_\_\_\_  
 Herpes 1 e 2  Epstein-Bar  Vírus da Varicela- Zoster
- 19. Você já teve alguma das doenças a abaixo?**  
 Gripe  Leishmaniose  Giardíase  Rubéola  Toxoplasmose  Malária  Dengue  
 Leptospirose  Pneumonia  Febre hemorrágica  Vermes  \_\_\_\_\_
- 20. Existe registro de casos de alguma dessas doenças no seu bairro?** Sim  não   
 Gripe  Leishmaniose  Giardíase  Rubéola  Toxoplasmose  Malária  Dengue   
 Leptospirose  Pneumonia  Febre hemorrágica  Vermes  \_\_\_\_\_
- 21. Se você já teve algum verme, você tratou?** Sim  Não  com o que? \_\_\_\_\_
- 22. Já ouviu falar sobre hantavírus?**  Sim  Não
- Fontes de informação:**
- TV  Rádio  Amigos/família  Serviço de saúde  Palestra  Outros: \_\_\_\_\_
- 23. Como se pega Hantavírus?**
- Doenças transmitidas por roedores  Doença transmitida pelo cão
- Doença transmitida por mosquito  Doença transmitida por água
- Não sabe  Outros: \_\_\_\_\_

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

Você tem animais?  Sim  Não

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

Qual tamanho do pelo do seu animal (Curto/Longo)? \_\_\_\_\_

Seus animais são vacinados?  Sim  Não  Não sabe

Você leva seu animal ao veterinário?  Sim  Não

Com que frequência no ano?  0  1  2  3  4  5 ou mais

Seu animal tem muita infestação de carrapatos?  Sim  Não

Seu animal tem muita infestação de pulgas?  Sim  Não

O seu bicho de estimação fica em que parte da sua casa?

**Cão:** Área externa  Dentro da casa  Ambos

**Gato:** Área externa  Dentro da casa  Ambos

Você permite que seu animal transite solto na rua sem sua supervisão?  Sim, frequentemente   
 Sim, esporadicamente  Não

O seu gato (s) ou cachorro (s) dorme (m) onde?  Na sua cama  no sofá da sua casa

Na garagem  em algum lugar dentro da sua casa  na parte externa da casa

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

Se sim, quantas vezes isso já aconteceu? \_\_\_\_\_

Como você alimenta seus animais?  Somente ração  Carne crua   
 Comida enlatada  Resto de comida

Guarda a comida dos animais em recipientes  Sim  Não  
fechados?

Você guarda as coisas do (s) seu (s) animal (is) em  Sim  Não  
local separado das suas coisas ou das pessoas que  
moram com você?

Quantas vezes por semana você limpa o local onde  0  1  2  3  4  5 ou mais   
seu cão ou gato fica?

Você usa luvas para fazer a limpeza dos objetos ou  Sim  Não  
locais onde seu (s) animal (is) fica (m)?

Você costuma caçar animais?  Sim  Não Quais? \_\_\_\_\_

Você mata ou captura roedores?  Sim  Não

Se sim, como (ratoeira, arma)? \_\_\_\_\_

Já observou se há ratos próximos da sua casa?  Sim  Não

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

Se sim, quais?  Fezes  Materiais roídos  Pegadas  Tocas

Odor característico  Presença própria do animal

Você já matou algum roedor em casa?  Sim  Não

Você já matou algum roedor na área de trabalho?  Sim  Não

Já foi mordido por um roedor ou outro animal?  Sim  Não

Você já comeu carne de roedores?  Sim  Não

Você cria cobras?  Sim  Não

Costuma alimentá-las com animais vivos?  Sim  Não Quais? \_\_\_\_\_

**Seu (s) animal (is) de estimação já teve (tiveram) verminose?** Sim  não

**Levou ao veterinário?** Sim  não   **você tratou?** Sim  não

**Você acha que crianças podem morar em casas onde tem animais?** Sim  não

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

**Sabe o que são zoonoses?** Sim  não

## 25. Informação sobre contato com área de floresta

Você visitou ou teve contato com floresta?  Sim  Não

Quando? \_\_\_\_\_

Costuma visitar fazenda ou xacara?  Sim  Não

Costuma tomar banho em locais abertos ou tem o hábito de ir a áreas de banhos em rios?  Sim  Não

Costuma fazer passeios ou acampamentos em áreas de floresta?  Sim  Não

Há hortas, plantações ou árvores frutíferas em volta da casa?  Sim  Não

Qual a distância? (< 400m)  Sim  Não

Mora perto da floresta ou fragmentos de floresta?  Sim  Não

A que distância? \_\_\_\_\_

Mora ou trabalha perto de áreas de criação de animais (aviários,  Sim  Não

suínos, bovinos, caprinos, etc.)?

Você já participou de algum desmatamento na floresta?  Sim  Não Quando? \_\_\_\_\_

Você já trabalhou com agricultura?  Sim  Não Quando? \_\_\_\_\_

Você possui depósito ou galpão para armazenamento de grãos ou produtos da colheita em casa?  Sim  Não

## 26. Informação sobre limpeza

Usa luvas para limpeza da casa e quintal?  Sim  Não

Acumula entulho/lixo ao redor ou fora da casa?  Sim  Não

Lixo aberto ou mal acondicionado?  Sim  Não

Usa sabão para lavar as mãos?  Sim  Não

Caso tenha, limpa a churrasqueira após o uso?  Sim  Não

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

28. A sua casa possui esgoto?  Sim  Não

## 29. Qual a estrutura da sua casa?

Tipo de parede:  Blocos de cimento  Argila ou blocos de barro  Tijolo

Pedra e cimento  Pedra e lama  Madeira e lama  \_\_\_\_\_

Tipo de telhado:  Capim  Telha  Zinco  Lona/toldo

30. Tem muito mosquito (carapanã) onde você mora?  Sim  Não

## 31. Informações das características do mosquito

Qual o criadouro mais comum?

Água parada limpa  Água corrente limpa  Plantas/vegetações  Não sabe

Água parada tarde  Água corrente suja  Lixo  Outros

Qual o horário mais frequente?

Pôr do sol/escurecer  Manhã  Meio-dia

Nascer do sol/amanhecer  Noite  Outros  Não sabe

32. Conhece alguém perto da sua casa que teve dengue?  Sim  não

33. Você realiza as medidas preventivas contra o mosquito da dengue conforme as Campanhas em Saúde divulgam?  Sim  Não

## 34. Se sim, algumas informações das medidas preventivas contra o mosquito.

Qual tipo de prevenção utilizada contra a picada do mosquito?

Spray  Tela de janela e porta  Cremes e repelentes  Ventilador

Líquido vaporizador  Mosquiteiro (cama)  Fumaça para dispersar  Janela fechada

Casa limpa  Limpeza lixo  Higiene pessoal  Cobertura do corpo com roupas

Evitar água parada  Educação contínua  Outros  Não sabe

Erradicação/extinção do criadouro do mosquito?

Prevenção de água parada  Cobertura dos recipientes  Outros

Água em tanques de armazenamento  Corte de árvores/vegetais  Não sabe

35. Você já teve Malária?  Sim  Não quando? \_\_\_\_\_

36. Você já teve Dengue?  Sim  Não quando? \_\_\_\_\_

**37. Você já tomou vacina contra Febre Amarela?**       Sim       Não

**Mais informações:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**OBRIGADO PELA COLABORAÇÃO!**



## APÊNDICE F – Questionário aplicado aos militares



Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

### Questionário

1. Nome: \_\_\_\_\_
2. Qual a sua idade? \_\_\_\_\_
3. Sexo:  Masculino  Feminino
4. Município: \_\_\_\_\_
5. Comunidade: \_\_\_\_\_
6. Zona rural: \_\_\_\_\_
7. Há quanto tempo você mora nesta área? \_\_\_\_\_
8. Como você classifica a cor de sua pele/raça?
  - Branco  Pardo  Preto  Amarelo  negro x índio  branco x índio  branco x negro
9. Qual o seu grau de escolaridade?
 

<input type="checkbox"/> Analfabeto	<input type="checkbox"/> 1a a 3a série do ensino fundamental
<input type="checkbox"/> 4a a 7a série do ensino fundamental	<input type="checkbox"/> Ensino fundamental complete
<input type="checkbox"/> 1a ou 2a série do ensino médio	<input type="checkbox"/> Ensino médio complete
<input type="checkbox"/> Superior incompleto	<input type="checkbox"/> Superior complete
10. Renda Familiar:  até 1 salário  2 salários  3 salários  4 salários  5 ou mais salaries
11. Nos últimos 12 meses, qual foi sua principal ocupação? [Entrevistador: com a ajuda do entrevistado, classifique a ocupação no grupo ocupacional mais adequado]
  - Altos funcionários do governo, dirigentes, gerentes ou altos funcionários de empresa
  - Profissionais de nível superior
  - Profissionais das artes
  - Profissionais ou técnicos de nível médio
  - Trabalhadores de serviços administrativos
  - Trabalhadores da prestação de serviços e comerciários
  - Trabalhadores de serviços domésticos
  - Trabalhadores agropecuários, florestais de caça e pesca
  - Trabalhadores manuais (produção de bens e serviços industriais)
  - Trabalhadores manuais da construção civil
  - Trabalhadores manuais de reparação e manutenção
  - Membros das forças armadas, policiais e bombeiros militares
  - Ocupações mal especificadas do trabalho informal (ambulante, manobrista, guardador de carro, etc.)

**12. Quais e quantos dos itens abaixo existem na casa onde você mora?**

Banheiro	<input type="checkbox"/> Não tem	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4 ou +
Automóvel	<input type="checkbox"/> Não tem	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4 ou +
TV	<input type="checkbox"/> Não tem	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4 ou +
DVD	<input type="checkbox"/> Não tem	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4 ou +
Computador (internet)	<input type="checkbox"/> Não tem	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4 ou +
Celular	<input type="checkbox"/> Não tem	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4 ou +
Fogão	<input type="checkbox"/> Não tem	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4 ou +
Geladeira	<input type="checkbox"/> Não tem	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4 ou +
Freezer	<input type="checkbox"/> Não tem	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4 ou +
Microondas	<input type="checkbox"/> Não tem	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4 ou +
Máquina de lavar	<input type="checkbox"/> Não tem	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4 ou +

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

Sim  Não

**14. Você tem: Diabetes, Hipertensão, Lúpus, Câncer ou outro doença?**  Sim  Não

Outro: \_\_\_\_\_

**15. Você é usuário do SUS?**  Sim  Não

**16. Já ouviu falar sobre hantavírus?**  Sim  Não

**Fontes de informação:**

- TV  
 Rádio  
 Amigos/família  
 Serviço de saúde  
 Palestra  
 Outros \_\_\_\_\_

**17. Como se pega Hantavírus?**

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

**18. Informação sobre animais**

- Você tem animais?  Sim  Não
- Gatos (quantos, idade)  Sim  Não \_\_\_\_\_
- cães (quantos, idade)  Sim  Não \_\_\_\_\_
- Seu animal costuma capturar ou comer ratos?  Sim  Não \_\_\_\_\_
- Seus animais são vacinados?  Sim  Não  Não sabe

**19. Informação**

- Você visitou ou teve contato com floresta  Sim  Não  
Quando? \_\_\_\_\_
- Costuma visitar fazenda ou xácara?  Sim  Não \_\_\_\_\_
- Você mata ou captura roedores?  Sim  Não
- Tem gramado em volta de sua casa?  Sim  Não
- Há hortas e plantações em volta da casa?  Sim  Não
- Qual a distância? (< 400m)  Sim  Não
- Entulho/lixo ao redor da casa  Sim  Não
- Lixo aberto ou mal acondicionado  Sim  Não
- Fezes ou urina de roedores visíveis na residência ou no trabalho?  Sim  Não
- Costuma limpar a mesa após as refeições?  Sim  Não
- Guarda a comida dos animais em recipientes fechados?  Sim  Não
- Usa luvas para limpeza da casa e quintal?  Sim  Não
- Usa sabão para lavar as mãos?  Sim  Não
- Usa ratoeira para capturar roedores?  Sim  Não
- Acumula lixo fora da casa?  Sim  Não
- Limpa a churrasqueira após o uso?  Sim  Não
- Mantém em casa muitos alimentos da colheita  Sim  Não
- Há ratos próximos da sua casa?  Sim  Não
- Você ver ratos nas áreas de agricultura?  Sim  Não
- Você já matou algum roedores em casa?  Sim  Não
- Você já matou algum roedores na área de trabalho?  Sim  Não
- Já foi mordido por roedores?  Sim  Não
- Você usa ratos como isca para a pesca?  Sim  Não
- Você já comeu carne de roedores?  Sim  Não
- Você tem cobra em casa?  Sim  Não
- Você costuma alimentar esta cobra com animais vivos?  Sim  Não
- Mora próximo área de agricultura?  Sim  Não
- Há árvores frutíferas perto da casa?  Sim  Não
- Mora perto da floresta?  Sim  Não
- A que distância?  Sim  Não \_\_\_\_\_
- Costuma tomar banho em locais abertos?  Sim  Não
- Há árvores frutíferas perto da casa?  Sim  Não
- É fumante?  Sim  Não
- Você já teve Malária?  Sim  Não Quando? \_\_\_\_\_
- Você já teve Dengue?  Sim  Não Quando? \_\_\_\_\_

- Você já foi mordido por um roedor?  Sim  Não Quando? \_\_\_\_\_
- Você já trabalhou com agricultura?  Sim  Não Quando? \_\_\_\_\_
- Você costuma caçar?  Sim  Não Quais? \_\_\_\_\_
- Você já participou de algum desmatamento na floresta?  Sim  Não Quando? \_\_\_\_\_

### 20. Informação sobre limpeza

	Diariamente	Dias alternados	1/semana	2/semana	3/semana	A cada 15 dias	Outro	Ignorado
limpeza da casa								
limpeza da área externa								
descarte do lixo								

### Informações adicionais

---



---



---



---

## APÊNDICE G – Preparação de células eletrocompetentes

1. Plaquear as células de interesse em meio LB ágar;
2. Encubar a 37°C por 16 horas ou overnight;
3. Inocular uma colônia em 3 ou 5 ml de meio LB sem antibiótico;
4. Encubar a 37°C por 16 horas ou overnight;
5. Transferir 2 ml da cultura em 50 ml de LB sem antibiótico;
6. Encubar a 30 °C, 250 rpm, até a OD<sup>600</sup> 0,5 – 07;
7. Encubar em gelo por 15 minutos;
8. Centrifugar a 3000 rpm, por 10 minutos a 4°C. Ao final, descartar o sobrenadante ;
9. Ressuspender com cuidado o pellet formado em 50 ml de Glicerol 10% gelado;
10. Encubar em gelo por 15 minutos;
11. Centrifugar novamente e descartar o sobrenadante;
12. Repetir a lavagem com glicerol 10% gelado mais 3 vezes, ressuspendendo com os volumes de 10 ml, 4 ml e 1 ml;
13. Preparar alíquotas de 80 µL em microtubos;
14. Armazenar imediatamente na temperatura de 80°C negativo.

## APÊNDICE H – TAMPÕES

1. Tampões da extração e da purificação		
Extração	Extração e purificação	Purificação
<b>Tampão A</b> Tris HCL 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM pH 8,0	Tampão B Tris HCL 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM Uréia 8 M pH 8,0	Tampão C Tris HCL 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM Uréia 8 M Imidazol 500Mm Glicerol pH 8,0
2. Tampões de Diálise		
Solução I	Solução II	
Tris HCL 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM Uréia 4 M pH 7,0	Tampão B Tris HCL 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM Uréia 0,5 M pH 7,0	

Tabela 17. 1) Tampões utilizados nas fases de extração e purificação; 2) tampões da diálise para redução da concentração da uréia, reduzindo das condições desnaturantes da proteína recombinante.

## APENDICE I – SOLUÇÕES

---

### Lista de reagentes para elisa

---

#### **1. PBS 1X**

2,32 g NaHPO<sub>4</sub> 10mM  
0,2 g KCl 2,7 mM  
0,2 g K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM  
8,0 g NaCl 137 mM  
q.s.p. 1L água MilliQ  
pH 7,4

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

---

#### **2. Solução de lavagem (PBS-T 0,05%)**

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

---

#### **3. Solução diluição do antígeno (bicarbonato/carbonato) 0,05M**

2,65 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
2,1g NaHCO<sub>3</sub>  
qsp 500 ml água MilliQ  
pH 9,6

obs.: manter a 4°C

---

#### **4. Solução de bloqueio (LD10%)**

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

obs.: sempre preparar no dia do procedimento e durante procedimento, manter esse reagente a 4°C para prevenir contaminação do leite

---

#### **5. Solução de diluição de anticorpo (PBS-T + LD10%)**

PBS pH 7,4  
+ 0,05% de Tween 20 (PBS-T)  
+ leite desnatado 10% (LD 10%)

obs.: sempre preparar no dia do procedimento e durante procedimento, manter esse reagente a 4°C para prevenir contaminação do leite

---

## APENDICE J – REAÇÕES

<b>Componente</b>	<b>Reação 10µL</b>
<b>Tampão NEBuffer 3 10x *</b>	1 µL
<b>BSA 10x* (1 µg/µL)</b>	1 µL
<b>pBSKN_AM_Hanta</b>	2 µL (160ng)
<b>pGS21a modificado</b>	5 µL (150ng)
<b>NdeI*</b>	0,5µL (20 U)
<b>NotI*</b>	0,5 µL (10 U)
<b>H2O q.s.p</b>	Para 10µL

Tabela 18. Componentes da reação de digestão analítica realizada em dois microtubos, um para cada plasmídeo.

\*new england Biolabs® inc

<b>Componente</b>	<b>Reação 50µL</b>
<b>Tampão NEBuffer 3 10x *</b>	5 µL
<b>BSA 10x* (1 µg/µL)</b>	5 µL
<b>pBSKN_AM_Hanta</b>	10 µL (800ng)
<b>pGS21a modificado</b>	25 µL (750ng)
<b>NdeI*</b>	2,5µL (100 U)
<b>NotI*</b>	2,5 µL (50 U)
<b>H2O q.s.p</b>	Para 50µL

Tabela 19. Componentes da reação de digestão de maior volume realizada em dois microtubos, um para cada plasmídeo

\*new england Biolabs® inc.

<b>Componente</b>	<b>Reação 10µL</b>
<b>Tampão ligase T4 ligase 10x *</b>	1µL
<b>pGS21a modificado</b>	3 µL (150ng)
<b>Inserto N_H_Hanta</b>	1,8 µL (80 ng)
<b>T4 ligase</b>	1 µL
<b>H2O q.s.p</b>	Para 10µL

Tabela 20. Sistema de ligação