

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Medicina Tropical**

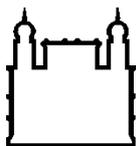
**Doutorado em Medicina Tropical**

**CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS GASTROENTÉRICOS EM CRIANÇAS COM  
DOENÇA DIARREICA E COINFECTADAS OU NÃO PELO VÍRUS DA  
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV-1) HOSPITALIZADAS NO RIO DE  
JANEIRO.**

Silvana Augusta Rodrigues Portes

**Rio de Janeiro**

**2017**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**Silvana Augusta Rodrigues Portes**

**CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS GASTROENTÉRICOS EM CRIANÇAS COM  
DOENÇA DIARREICA E COINFECTADAS OU NÃO PELO VÍRUS DA  
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV-1) HOSPITALIZADAS NO RIO DE  
JANEIRO.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical (área de concentração Diagnóstico, Epidemiologia e Controle).

**Orientador (es):** Dr. Eduardo de Mello Volotão  
Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa

**RIO DE JANEIRO**

2017

Portes, Silvana Augusta Rodrigues .

Caracterização de vírus gastroentéricos em crianças com doença diarreica e coinfectadas ou não pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) hospitalizadas no Rio de Janeiro / Silvana Augusta Rodrigues Portes. - Rio de Janeiro, 2017.

145 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientador: Eduardo de Mello Volotão.

Co-orientador: Filipe Anibal Carvalho Costa.

Bibliografia: f. 94-126

1. Vírus gastroentéricos. 2. Doença diarreica. 3. Crianças HIV-1 soropositivas. 4. Crianças HIV-1 soronegativas. 5. Vírus emergentes. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**Silvana Augusta Rodrigues Portes**

**CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS GASTROENTÉRICOS EM CRIANÇAS COM  
DOENÇA DIARREICA E COINFECTADAS OU NÃO PELO VÍRUS DA  
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV-1) HOSPITALIZADAS NO RIO DE  
JANEIRO.**

**Orientador (es):** Dr. Eduardo de Mello Volotão  
Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa

**Banca examinadora:**

Dr<sup>a</sup> Flavia Barreto dos Santos. IOC - FIOCRUZ. Revisora - Presidente

Dr. José Nelson dos Santos Silva. UFRJ/RJ

Dr Paulo Roberto Soares Stephens. IOC - FIOCRUZ.

Dr<sup>a</sup> Luzia Maria de Oliveira Pinto. IOC - FIOCRUZ.

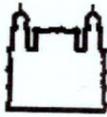
Dr<sup>a</sup> Jurandy Susana Patricia Ocampo. IOC- FIOCRUZ.

Suplentes:

Dr<sup>a</sup> Monique da Rocha Queiroz Lima. IOC - FIOCRUZ.

Dr<sup>a</sup> Ana Maria Viana Pinto. UFF- RJ

Rio de Janeiro, 17 de Agosto de 2017.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de **Silvana Augusta Rodrigues Portes**, sob orientação do Dr. Eduardo de Mello Volotão e Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa. Ao décimo sétimo dia do mês de agosto de dois mil e dezessete, realizou-se às nove horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: "**Caracterização de vírus gastroentéricos em crianças com doença diarreica e coinfectadas ou não pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) hospitalizadas no Rio de Janeiro**" no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Diagnóstico de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Flávia Barreto dos Santos - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. José Nelson dos Santos Silva Couceiro - UFRJ/RJ, Dr<sup>a</sup>. Luzia Maria de Oliveira Pinto - IOC/FIOCRUZ, Dr. Paulo Roberto Soares Stephens - IOC/FIOCRUZ, Dr<sup>a</sup>. Jurandy Susana Patricia Morales Ocampo - UNIRIO/RJ e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Monique da Rocha Queiroz Lima - IOC/FIOCRUZ e Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Viana Pinto - UFF/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APPROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 17 de agosto de 2017.

Dr<sup>a</sup>. Flávia Barreto dos Santos (Presidente da Banca):

Dr. José Nelson dos Santos Silva Couceiro (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Luzia Maria de Oliveira Pinto (Membro da Banca):

Dr. Paulo Roberto Soares Stephens (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Jurandy Susana Patricia Morales Ocampo (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis (Coordenadora do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360  
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: [atendimento@ioc.fiocruz.br](mailto:atendimento@ioc.fiocruz.br) Site: [www.fiocruz.br/iocensino](http://www.fiocruz.br/iocensino)

Trabalho realizado no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA), Laboratório de Referência Regional para Rotavíruses (LRRR), do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro.

Dedico este trabalho aos meus pais, esposo, filhos, irmãos e amigos, fontes de inspiração e amor.

*“Uma vida não questionada não merece ser vivida.”*

*Platão*

*“Quanto mais me aprofundo na Ciência mais me aproximo de Deus.”*

*Albert Einstein*

## **AGRADECIMENTOS**

Não foi fácil iniciar os agradecimentos, a emoção se fez presente.

Inicialmente agradeço ao Programa de Pós-Graduação de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, especialmente na pessoa da Dr<sup>a</sup> Martha Cecilia S. Mutis coordenadora e ao corpo docente, pela oportunidade ímpar e pelos conhecimentos transmitidos;

Aos meus orientadores Dr. Eduardo de Mello Volotão e Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa, pela dedicação, confiança, apoio, ensinamentos e principalmente pelo incentivo. Sou grata por ser orientada por profissionais tão atenciosos e grandes amigos;

À Dr<sup>a</sup>. Marize Pereira Miagostovich, por acreditar na minha capacidade, pelos incentivos e apoio. Sua disponibilidade foi fundamental para que eu buscasse dentro de mim forças para continuar. Um exemplo de profissional, sempre atenta às dificuldades do outro. Obrigada por muitas vezes me mostrar o caminho e por disponibilizar recursos materiais e humanos para o desenvolvimento desse trabalho;

Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, pela dedicação, incentivo e cuidado comigo. É uma honra, um privilégio, conviver com um profissional com tamanha capacidade científica. Profissional exemplar, dedicado e comprometido com tudo que faz. Um amigo de longa data e a quem devo muito. Muito obrigada por tudo;

À Dr<sup>a</sup>. Myrna Santos Rocha, médica do Hospital Municipal Jesus, onde foram realizadas a coleta do material clínico e por disponibilizar o acesso aos prontuários dos pacientes;

À Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ pelo sequenciamento das amostras utilizadas neste estudo;

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e a Dr<sup>a</sup> Flavia Barreto pela revisão da tese;

À Mônica Simões Rocha, minha grande amiga, irmã de coração, madrinha dos meus filhos, companheira de todos os momentos, principalmente nos piores, ao longo da vida. Sua força, suporte e estímulo de forma incondicional. Obrigada por poder contar com você e toda sua família. Minha gratidão é eterna, nesta vida e vidas futuras;

Aos amigos Túlio Fumian, Adriana Maranhão, Maria da Penha Xavier, Tatiana Rose, Sérgio Mouta, Fábio Malta, Janaína Rodrigues e Rosane Maria Assis, pela disponibilidade e contribuição direta nos resultados desse estudo;

Ao Alexandre Fialho, pela amizade, colaboração e ajuda com o banco de dados;

Um agradecimento especial aos alunos que estiveram sob minha orientação Bárbara Pimentel, Lendel Correia da Costa e Cecília Moreira Cruz, pela oportunidade de darmos os primeiros passos científicos juntos. Os queridos também jovens estudantes, Matheus Assis, Anna Carolina Tingá, Pedro Ivo, e Mariana Seglia, pela preciosa e efetiva contribuição no processamento das amostras;

Aos amigos do LVCA Márcia Terezinha Baroni, Marcelle Silva, Carmem Baur, Fernando Cesar, Márcia Pimenta, Irene Trigueiros, Mariela Martinez, Ana Caroline Ganime, Ana Pinto, e Juliana Andrade, meu carinho especial, por poder contar com o carinho e amizade de vocês;

À Francisca dos Santos, pessoa abençoada por Deus, sempre perto de todos para ajudar e que amo muito;

Aos meus amigos do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo, onde trabalhei muitos anos, Marilda Siqueira, Tania da Silva Andrade, Fernando Mota, Xênia Lemos e Jalusy Maria de Almeida, pelo companheirismo nestes longos anos de convivência. E aqueles que já não estão mais no IOC, Edson Pereira, Joeler Vargas e Julia Fioretti, muito obrigada pela amizade de vocês;

Aos meus queridos e inesquecíveis amigos, Jussara Pereira do Nascimento (minha mentora, chefe e orientadora de mestrado), Murilo Matins Krawczuk, Dora e Clóvis Pascarelli, companheiros de trabalho por muitos anos, que sempre torceram por mim, que hoje habitam o plano espiritual, meus eternos agradecimentos e saudades;

As Dr<sup>as</sup>. Elba Lemos e Renata Carvalho, pelo aprendizado e grata satisfação em participar da disciplina- Doenças Produzidas por Vírus e Virologia Humana- que teve como produto uma publicação. De forma especial à Dr<sup>a</sup>. Elba, pelo incentivo e carinho. Não esquecendo os monitores, meus amigos Jorlan Fernandes, Alexandre dos Santos e Natália Lanzarini, obrigada;

À Livia Aqualuza Mangeon, secretária do programa da pós-graduação que atende as demandas dos alunos sempre com carinho e atenção, obrigada;

Aos meus colegas do curso de pós-graduação em Medicina Tropical pela ajuda e companheirismo;

Aos meus pais, Lúcia e Sebastião, por todo amor e dedicação que tiveram comigo. Exemplo de vida, amor incondicional, retidão, caridade, honestidade, abnegação e compaixão. Por minha formação como pessoa e profissional;

Ao meu marido Joelmir, esposo amoroso e pai exemplar, sou eternamente grata por sua paciência, compreensão, dedicação e apoio;

À todos os meus filhos, nascidos de mim (André Lúcio e Mateus), nascidos para mim (Lúcia) e para aqueles que me adotaram (Gabriel, Ricardo, Hugo, Anna, Paula e Rafael), razão de minha existência, dedico este trabalho a vocês esperando que sirva como exemplo de dedicação, perseverança e superação. Agradeço a compreensão nos momentos de mau humor e as palavras e os gestos que me impulsionaram a continuar. Sou eternamente grata a Deus, porque ter vocês, meus presentes;

À minha família, meus irmãos (Ricardo e Flávio), cunhados, sobrinhos, afilhados, tios, primos e amigos, obrigada por compreenderem minhas ausências e pelo amor que recebi de todos no decorrer desses anos de trabalho. Em especial, para meu irmão Ricardo e minha cunhada Celi, por estarem sempre presentes, tomando conta de mim e dos meus filhos;

E finalmente, agradeço a Deus, pela vida, sustentando-me nos momentos mais difíceis da minha caminhada.

## INDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	DOENÇA DIARREICA	1
1.2	VÍRUS GASTROENTÉRICOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA	3
1.2.1	Rotavírus A (RVA)	3
1.2.2	Norovírus (NoV)	6
1.2.3	Astrovírus humanos (HAstV)	10
1.2.4	Adenovírus humanos (HAdV)	13
1.3	VÍRUS EMERGENTES	17
1.3.1	Bocavírus humanos (HBoV)	17
1.3.2	Aichivírus (AiV-1)	20
1.4	DOENÇA DIARREICA EM PACIENTES SOROPOSITIVOS PARA O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV-1)	22
1.4.1	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) e a doença diarreica	22
1.4.2	Vírus gastroentéricos e emergentes em pacientes HIV-1 soropositivos, no mundo	26
1.4.3	Vírus gastroentéricos e emergentes em pacientes HIV-1 soropositivos, no Brasil	28
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	GERAL	32
3.1	ESPECÍFICOS	32
4	METODOLOGIA E RESULTADOS	33
4.1	Artigo 1- Aichi Virus Positivity in HIV-1 Seropositive Children Hospitalized with Diarrheal Disease	34
4.2	Artigo 2- Enteric Viruses in HIV-1 Seropositive and HIV-1 Seronegative Children with Diarrheal Diseases in Brazil.	42
4.3	Artigo 3- Recurrent infections with human adenoviruses in HIV-1 seropositive children with diarrheal disease in Brazil.	58
4.4	Artigo 4- A non-enteric adenovirus A12 gastroenteritis outbreak in Rio de Janeiro, Brazil	73
5	DISCUSSÃO	78
5.1	Frequência de detecção de AiV-1 em crianças HIV-1 soropositivas e HIV-1 soronegativas hospitalizadas com DD (Artigo 4.1)	78
5.2	Frequência de detecção de RVA, NoV, HAstV, HAdV e HBoV em crianças HIV-1 soropositivas e HIV-1 soronegativas hospitalizadas com DD (Artigo 4.2)	79
5.2.1	Rotavírus	80
5.2.2	Norovírus	80
5.2.3	Astrovírus humano	82
5.2.4	Adenovírus humano	83
5.2.5	Bocavírus humano	85
5.3	Avaliação da infecção recorrente por HAdV em crianças hospitalizadas com DD e coinfectadas pelo HIV-1 (Artigo 4.3)	87
5.4	Papel de HAdV12 como agente etiológico de surto de DD em crianças no RJ (Artigo 4.4)	89
6	CONCLUSÕES	90
7	PERSPECTIVAS	92
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
9	ANEXOS	127
9.1	Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz Fundação (FIOCRUZ) (311/2006)	127
9.2	Termo de ciência do Hospital Jesus	128

## Índice de Figuras

Figura 1: Aspectos estruturais dos rotavírus grupo A (RVA).	3
Figura 2: Características dos norovírus (NoV).	8
Figura 3: Características dos astrovírus humano (HAstV).	11
Figura 4: Estrutura tridimensional do adenovírus humano (HAdV).	15
Figura 5: Características dos bocavírus humanos (HBoV).	18
Figura 6: Organização genômica do aichivírus 1 (AiV-1).	21
Figura 7: Representação da partícula viral do vírus da imunodeficiência humana (HIV).	23
Figura 8: Organização do DNA proviral do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1).	24

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa- Aminoácido  
ABC- Abacavir  
AdV- Adenovírus  
AGE – Gastroenterite aguda, do inglês “Acute gastroenteritis”  
AIDS- síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês “Acquired immunodeficiency syndrome”  
AiV- Aichivírus humano  
AVP- Amprenavir  
AZT- Zidovudina  
BRA- Brasil  
CHN- China  
DD- Doença diarreica  
DDI- Didanosina  
DEU- Alemanha  
DNA- Ácido desoxirribonucléico  
D4T- Estavudina  
EAdV- Adenovírus entérico  
EBV- Vírus Epstein-Barr  
EFV- Efavirenz  
EGPA- Eletroforese em gel de poliacrilamida  
EIE – Ensaio imunoenzimático  
ELISA- Ensaio imunoenzimático, do inglês “Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay”  
FIOCRUZ ou Fiocruz– Fundação Oswaldo Cruz  
HAART- Terapia antirretroviral altamente ativa, do inglês “highly active antiretroviral therapy”  
HBoV- Bocavírus humano  
HAdV- Adenovírus humano  
HAdV-F-Adenovírus humano da espécie F  
HAstV- Astrovírus humano  
HIV- Vírus da imunodeficiência humana  
HMJ ou JMH- Hospital Municipal Jesus  
HMSN ou SNMH- Hospital Municipal Salles Neto  
HSV- Herpes simples  
HuCV- Calicivírus humanos  
ICTV- Comitê Internacional de Taxonomia dos vírus, do inglês “International Committee on Taxonomy of Viruses”  
IDN- Indonésia

IND- Índia  
ITRI- Infecção do trato respiratório inferior  
IQR- Intervalo interquartil  
IRES- Sítios Internos de Entrada Ribossomal, do inglês “internal ribosome entry sites”  
JPN- Japão  
PAK- Paquistão  
Kb- Kilobase  
LACEN- Laboratório Central de Saúde Pública  
LPV- Lopinavir  
LRRR ou RRRL- Laboratório de Referência Regional para Rotavíruses  
LVCA- Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental  
MS- Ministério da Saúde  
ME- Microscopia eletrônica  
MAstV- Mamastrovirus  
NEV ou NVP - Nevirapina  
NFV- Nelfinavir  
NoV- Norovírus  
nt- Nucleotídeo  
NP- Fosfo nucleoproteína, do inglês “nuclear phosphoprotein”  
NSP- Proteína não estrutural, do inglês “Non Structural Protein”  
OMS- Organização Mundial da Saúde, “World Health Organization-WHO”  
ORF- Fase aberta de leitura, do inglês “Open Reading Frame”  
pb- pares de base  
PCR- Reação em cadeia pela polimerase, do inglês “Polymerase chain protein”  
PFA- Paralisia flácida aguda  
qPCR- PCR quantitativa  
RNA- Ácido ribonucléico  
RNAfs- RNA de fita simples  
RNAfd- RNA de fita dupla  
RpRd - RNA polimerase RNA dependente  
RT-PCR- PCR precedida da transcriptase reversa  
RTV- Ritonavir  
RVA- Rotavírus espécie A  
SAQ-Saquinavir  
3TC- Lamivudina  
THA- Tailândia  
TDF-Tenofovir  
TN- Tunísia  
TP- Proteína terminal, do inglês “Terminal protein”

UTR- Região não traduzida, do inglês “Untranslated Region”

VPg- Proteína viral do genoma, do inglês “Viral protein genome”

## RESUMO

Os vírus gastroentéricos são associados a casos esporádicos e surtos de doença diarreica (DD). A DD é uma complicação frequente em crianças imunocompetentes e imunocomprometidas. O objetivo principal deste estudo, foi avaliar a frequência de detecção dos vírus gastroentéricos (rotavírus [RVA], norovírus [NoV], astrovírus [HAstV] e adenovírus [HAdV]) ou emergentes (bocavírus [HBoV] e aichivírus [AiV-1]), em crianças hospitalizadas com DD, infectadas ou não infectadas pelo HIV-1, no estado do Rio de Janeiro. Neste contexto, as taxas de detecção destes vírus nessas crianças, foram descritas e comparadas e, a infecção recorrente de HAdV em crianças soropositivas para HIV-1, foi avaliada. Além disso, foi possível investigar a etiologia viral de um surto de DD ocorrido no Rio de Janeiro, em 2013. O RVA foi detectado por ensaio imunoenzimático (EIE) e por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), sendo caracterizado por semi-nested multiplex RT-PCR. Os NoV, HAdV, HAstV, HBoV e AiV-1 foram detectados e caracterizados através da PCR ou RT-PCR e sequenciamento. A carga viral dos RVA, NoV, HAstV, HAdV e HBoV foram determinadas nas fezes das crianças estudadas. Nossos resultados, mostraram que o AiV-1, NoV, HBoV e HAdV foram significativamente mais frequentes entre as crianças HIV-1 soropositivas, enquanto RVA e HAstV foram significativamente menos frequentes entre essas crianças. A circulação do AiV-1 genótipos A e B foi demonstrada nas crianças estudadas. Foram observadas coinfeções nas crianças estudadas, sendo mais frequentes nas crianças com AIDS. A mediana da carga viral de HAstV nas fezes das crianças estudadas, foi significativamente maior entre as crianças HIV-1 positivas em comparação com crianças HIV-1 negativas, enquanto que para RVA, NoV, HBoV e HAdV, não houve significância nas medianas das cargas virais nas fezes destas crianças. NoV e o HBoV foram significativamente mais frequentes entre crianças com contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> < 200 células/mm<sup>3</sup>. Os dados apontam o NoV, AiV-1 e HAdV como patógenos oportunistas, infectando crianças com AIDS e DD. A diversidade genética foi demonstrada, sendo possível apresentar as variantes circulantes para os vírus estudados. A infecção recorrente por HAdV foi detectada entre as crianças HIV-1 soropositivas, com HAdV-F40, -F41 e D associados a diarreia crônica e persistente. O HAdV foi o único vírus detectado no surto de 2013, no Rio de Janeiro, sendo o HAdV-A12 associado ao surto. Os resultados obtidos neste estudo, mostram que os vírus gastroentéricos e emergentes devem ser considerados como causas importantes de DD em crianças HIV-1 soropositivas. Além disso, este estudo enfatiza a importância de investigar os vírus gastroentéricos e emergentes em casos de DD, especialmente em surtos, visando a vigilância desses vírus em DD em países onde a vacinação com RVA é rotineiramente realizada.

## ABSTRACT

Gastroenteric viruses are associated with sporadic cases and outbreaks of diarrheal disease (DD). DD is a frequent complication in immunocompetent and immunocompromised children. The main objective of this study was to evaluate the frequency of detection of gastroenteric (rotavirus [RVA], norovirus [NoV], astrovirus [HAstV] and adenovirus [HAdV]) or emergent (bocavirus [HBoV] and aichivirus [AiV-1]) viruses in children hospitalized with DD, infected or not infected by HIV-1, in the state of Rio de Janeiro. In this context, detection rates of these viruses in these children were described and compared, and recurrent HAdV infection in children HIV-1 seropositive was evaluated. In addition, it was possible to investigate the viral etiology of a DD outbreak occurred in Rio de Janeiro in 2013. The RVA was detected by immunoenzymatic assay (EIE) and by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), characterized by semi-nested multiplex RT-PCR. NoV, HAdV, HAstV, HBoV and AiV-1 were detected and characterized by PCR or RT-PCR and sequencing. The viral load of RVA, NoV, HAstV, HAdV and HBoV were determined in the feces of the studied children. Our results showed that AiV-1, NoV, HBoV and HAdV were significantly more frequent among children HIV-1 seropositive, whereas RVA and HAstV were significantly less frequent among these children. The circulation of the AiV-1 genotypes A and B was demonstrated in the studied children. Coinfections were observed in the studied children, being more frequent in children with AIDS. The median HAstV viral load in the feces of the children studied was significantly higher among children HIV-1 seropositive compared to children HIV-1 seronegative, while for RVA, NoV, HBoV and HAdV, there is no significance in the medians of the viral loads in the feces of these children. NoV and HBoV were significantly more frequent among children with TCD4<sup>+</sup> cells <200 cells / mm<sup>3</sup>. The data point to the NoV, AiV-1 and HAdV as opportunistic pathogen infecting children with AIDS and DD. The genetic diversity was demonstrated, being possible to present the circulating variants for the virus studied. Recurrent HAdV infection was detected among children HIV-1 seropositive with HAdV-F40, -F41 and D associated with chronic and persistent diarrhea. HAdV was the only virus detected in the 2013 outbreak in Rio de Janeiro, with HAdV-A12 associated with the outbreak. The results obtained in this study, show that the gastroenteric and emergent viruses should be considered as important causes of DD in children HIV-1 seropositive. In addition, this study emphasizes the importance of investigating the gastroenteric and emergent viruses in cases of DD, especially in outbreaks, aiming the surveillance of these viruses in DD in countries where vaccination with RVA is routinely performed.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA DIARREICA

A doença diarreica (DD) constitui a segunda maior causa de morte em crianças em todo o mundo, sendo superada apenas pela pneumonia (UNICEF 2016). É uma doença responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade e afeta de maneira desproporcional as crianças de países de baixa e média renda, as quais apresentam uma taxa de incidência maior, devido, principalmente, à má qualidade da água potável, ao saneamento inadequado e a fatores de risco nutricionais (Lamberti *et al.*, 2011).

Em 2015, a DD foi responsável por 9% dos óbitos de crianças menores de cinco anos, correspondendo a 1.400 mortes/dia (526.000 mortes/ano) e, aproximadamente 70% do óbitos, ocorrem entre as crianças durante os dois primeiros anos de vida (Liu *et al.*, 2016; UNICEF 2016).

No Brasil, o monitoramento das DD entre os anos de 2000 e 2011 notificou um total de 33.397.413 casos (<http://portal.saude.gov.br>). Em 2008, a estimativa de mortes devidas à DD no mundo em crianças menores de 5 anos contabilizou 1.336.289, sendo o Brasil responsável por 3.543 mortes (Black *et al.*, 2010; Luchs & Timenetsky, 2016).

A DD pode ser acompanhada por outros sinais e sintomas como febre, cefaleia, náuseas, vômito e dor abdominal. A DD aguda é autolimitada, porém, a correção da perda de água e eletrólitos através da re-hidratação oral ou intravenosa é necessária para evitar que a doença evolua para quadros mais graves (Kapikian, 2001; Munos, 2010).

Os casos de DD aguda são definidos clinicamente pela ocorrência de três ou mais evacuações líquidas ou de pouca consistência em um período de 24 horas, acompanhadas ou não de dois ou mais episódios de vômito ao dia (Rodriguez-Baez *et al.*, 2002). A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu diarreia persistente como um episódio diarreico de causa presumivelmente infecciosa que se inicia como um episódio agudo e se prolonga (com duração superior a 14 dias) de forma não usual, acarretando agravo do estado nutricional e condição de alto risco de vida (Andrade *et al.*, 2000; UNICEF 2016). A diarreia crônica é definida como alteração do

hábito intestinal, caracterizada pelo aumento do número de evacuações e/ou diminuição da consistência das fezes, com duração superior a 28 dias (Grohmann *et al.*, 1993). Existem várias causas para diarreia crônica, inclusive, infecção persistente, reinfecções e síndrome do intestino irritável pós-infecção (Pawlowski *et al.*, 2009; Juckett & Trivedi, 2011).

A DD é uma síndrome resultante da infecção da mucosa intestinal, causada por diversos patógenos como bactérias, vírus e outros parasitos que acometem tanto humanos como animais. Sem sinais clínicos que permitam um diagnóstico diferencial do agente etiológico associado a esta doença, a identificação desta é realizada através de diagnóstico laboratorial (Kilgore & Glass, 1997; Fontaine *et al.*, 2009).

Entre os vírus gastroentéricos de maior importância clínica associada aos episódios de DD destacam-se: os rotavírus (RVA), os norovírus (NoV), os astrovírus humanos (HAstV) e os adenovírus humanos (HAdV) entéricos ou fastidiosos (HAdV-F) (Okitsu-Negishi *et al.*, 2004, Akihara *et al.*, 2005, Sdiri-Loulizi *et al.*, 2008; Lanata *et al.*, 2013; Sidoti *et al.*, 2015), afetando crianças nos primeiros anos de vida, idosos e pacientes imunocomprometidos (Gallimore *et al.*, 2004, Akihara *et al.*, 2005, Gabbay *et al.*, 2005; Al Anazi, 2009; Leblanc *et al.*, 2017).

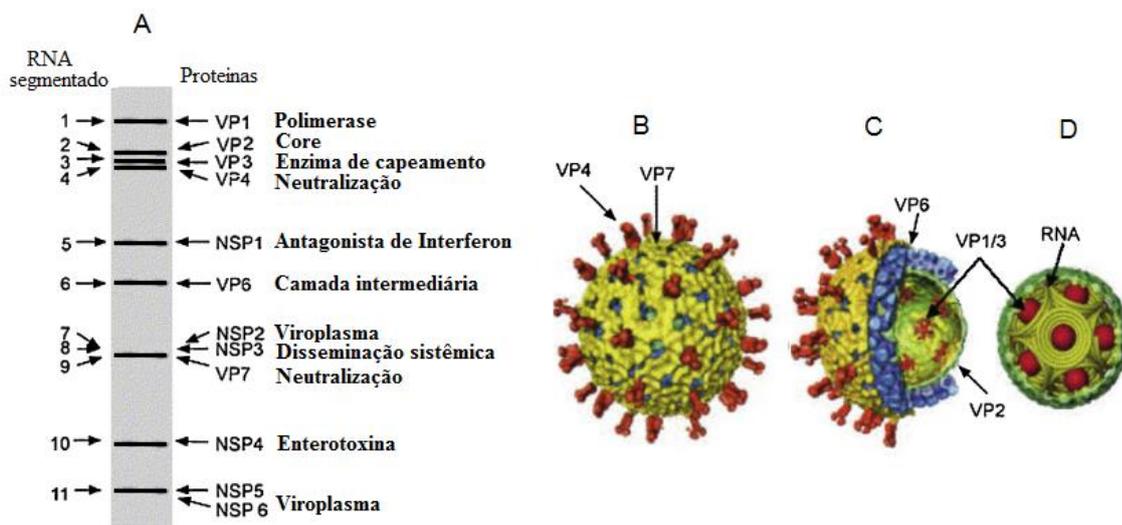
Outros vírus, como os emergentes aichivirus (AiV-1) e bocavírus (HBoV), foram recentemente descritos em pacientes com diarreia, mas sua associação com DD ainda não foi estabelecida claramente (Yamashita *et al.*, 1995, 2000; Oh *et al.*, 2006; Ambert-Balay *et al.*, 2008; Le Guyader *et al.*, 2008; Pham *et al.*, 2007, 2008; Arthur *et al.*, 2009; Chow & Esper, 2009; Reuter *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Sdiri-Loulizi *et al.*, 2008, 2009; Kaikkonen *et al.*, 2010; Räsänen *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010; Chhabra *et al.*, 2013; Guido *et al.*, 2016).

## 1.2 VÍRUS GASTROENTÉRICOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

### 1.2.1 Rotavírus A (RVA)

Os rotavírus pertencem ao gênero *Rotavirus* e a família *Reoviridae*. As partículas virais íntegras são esféricas, com aproximadamente 70 a 100nm de diâmetro, possuem capsídeo com simetria icosaédrica e sem envoltório. O capsídeo é formado por três camadas protéicas (triplo capsídeo): capsídeo externo, composto pelas proteínas VP4 e VP7, que são as proteínas responsáveis pela ligação e penetração dos RV nos enterócitos; capsídeo intermediário/, composto pela proteína VP6, que é a proteína encontrada em maior quantidade (51%) na partícula viral, altamente antigênica e imunogênica; capsídeo interno ou core viral, onde se encontra o genoma viral segmentado e as proteínas VP1, VP2 e VP3, juntas estas proteínas representam aproximadamente 18% das proteínas virais (Kapikian *et al.*, 2001; Greenberg & Estes, 2009; Desselberger, 2014).

O genoma viral é *constituído* por RNA de fita dupla (RNAfd) dividido em 11 segmentos, totalizando aproximadamente 18.522 pb, que são responsáveis pela síntese das proteínas virais estruturais (VP) e as proteínas não estruturais (NSP) (Kapikian *et al.*, 2001; Desselberger, 2014).



**Figura 1: Aspectos estruturais dos rotavírus grupo A (RVA).** A- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA) demonstrando seus 11 segmentos RNAfd numerados à esquerda e as proteínas codificadas à direita. B- Reconstrução da camada tripla por

criomicroscopia eletrônica. Com as espículas VP4 representadas em laranja e VP7 em amarelo. C- Vista em corte da tripla camada, demonstrando camada intermediária VP6 em azul e a camada de VP2 em verde com as enzimas de transcrição em vermelho ancoradas no seu interior. D- Representação esquemática da organização do genoma com segmentos representados como espirais cônicas invertidas, em torno das enzimas de transcrição (bolas em vermelho) e no interior da camada VP2 em verde (Adaptado de Greenberg & Estes, 2009 e de Desselberger, 2014).

As partículas virais maduras dos RVA possuem seis proteínas estruturais (VPs) e seis proteínas não estruturais (NSPs), que são codificadas pelos 11 segmentos ou genes do RNAfd. Cada gene codifica para uma proteína viral, com exceção do gene 11 que codifica para duas proteínas (Kapikian *et al.*, 2001; Greenberg & Estes, 2009; Desselberger, 2014).

Os RV estão classificados em oito grupos ou espécies (A-H), com base nas propriedades antigênicas ou, mais recentemente, nas sequências de nucleotídeos da proteína VP6 (Mattijnssens *et al.*, 2012). O grupo H (RVH) foi sugerido a partir da descrição e da análise filogenética da VP6 de RV associado a infecções em adultos e um semelhante detectado em suíno (Wakuda *et al.*, 2011; Mattijnssens *et al.*, 2012). Um possível nono grupo (I) descrito em cães está sendo sugerido por Mihalov-Kovács e colaboradores (2015).

As infecções em humanos têm sido atribuídas aos RV dos grupos A, B e C. Os RV dos grupos grupo D e G foram identificados, até o momento, somente em animais. Os RVA são epidemiologicamente mais importantes, porque são os principais responsáveis por episódios de diarreia aguda em crianças menores de cinco anos de idade em todo o mundo (Kapikian *et al.*, 2001; Desselberger, 2014).

A classificação dos RVA em sorotipos e genótipos consiste em um sistema binário, baseado na especificidade das proteínas que constituem o capsídeo externo, que são as proteínas estruturais VP7 e VP4 (Estes, 2001; Kapikian *et al.*, 2001). Dessa forma, as cepas de RVA são classificadas com base em VP4 em genótipos P (P-sensível à protease) e com base em VP7 em genótipos G (G- glicoproteína). Para os tipos G, os sorotipos e genótipos são equivalentes (G1, G2, etc), enquanto para o P existem muitos mais genótipos P do que sorotipos P (por não existir soros e anticorpos monoclonais disponíveis para tipagem). Assim, foi introduzida uma dupla

nomenclatura, P1A [8] que designa o sorotipo 1A e o genótipo [8] (Estes & Greenberg, 2013; Desselberger, 2014)

Matthijnssens e colaboradores em 2008 propuseram e, em 2011, estabeleceram um novo sistema de classificação para os RVA, tendo como base as propriedades moleculares dos 11 segmentos genômicos. Este novo sistema de classificação foi baseado na caracterização molecular e análise filogenética do genoma completo de 53 protótipos. Por este sistema, foram escritos diferentes genótipos para cada um dos 11 segmentos, sendo os genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 das cepas de RVA descritos utilizando as abreviações Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x- representa o número arábico iniciando-se a partir do 1), respectivamente.

Até o momento, foram descritos 35 genótipos G e 50 genótipos P (Rotavirus Classification Working Group: RCWG, 2017), com mais de 40 combinações G-P já descritas. Estudos de epidemiologia molecular tem demonstrado que a grande maioria dos RVA associados à DD tem as combinações G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] ou G9P[8] como as mais prevalentes em humanos em todo o mundo. Recentemente, o genótipo G12P[8], considerado um genótipo emergente, também tem sido detectado mundialmente, inclusive no Brasil. Os genótipos G e P podem variar, em função do ano e lugar, levando ao surgimento de combinações incomuns como: G1P[4], G1P[6], G2P[6], G2P[8], G3P[6], G9P[4], G12P[6] e a G12[8] também identificadas em diferentes regiões do mundo (WHO, 2011; Luchs & Timenetsky, 2016).

Os RVA são os principais agentes etiológicos virais da DD, em crianças menores de cinco anos de idade em todo o mundo, sendo responsáveis por 215.000 óbitos entre estas crianças, com a maioria dos casos ocorrendo em países em desenvolvimento (Tate *et al.*, 2016).

Devido à importância epidemiológica dos RVA e impacto em saúde pública, duas vacinas atenuadas estão licenciadas e vem sendo utilizadas em 77 países: a monovalente, preparada a partir de uma cepa humana genótipo G1P[8] Rotarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica), licenciada em 2005 e a pentavalente G1, G2, G3, G4 e P[8] RotaTeq® (Merck & Co. Inc., West Point, Pensilvânia) em 2006. Estas vacinas reduziram significativamente o número de visitas médicas, hospitalizações e mortalidade infantis associadas aos RVA, sendo menos

eficazes, como demonstrado por ensaios clínicos, em alguns países de baixa renda (Desselberger, 2014; Luchs & Timenetsky, 2016).

A Rotarix® foi introduzida no calendário brasileiro de imunizações em março de 2006 e foram observadas reduções na detecção de RVA de 38% em 2005 para 24% em 2007 (Carvalho-Costa *et al.*, 2009). Em um estudo de revisão sobre o impacto da vacinação de RVA no Brasil, foram reportadas reduções de 48% nas hospitalizações e 54% nos óbitos entre as crianças menores de um ano de idade (Linhares & Justino, 2014). As combinações genotípicas mais frequentemente detectadas em dois períodos pré-vacinais 1982-1995 e 1996-2005 foram: G1P[8]/G1P[?] (43%), G9P[8]/G9P[?] (20%), G2P[4]/G2P[?] (9%), G3P[8]/G3P[?] (6%), G4P[8]/G4P[?] (4%) e G5P[8]/G5P[?] (4%) (Leite *et al.*, 2008). No período pós-vacinal, foi observada a reemergência de G2P[4] de 2005 a 2008, com diminuição da taxa de detecção deste genótipo em 2009, provavelmente refletindo as oscilações naturais de genótipos de RVA (Carvalho- Costa *et al.*, 2009; Linhares & Justino, 2014).

A via de transmissão habitual é a fecal-oral, incluindo fômites, contato pessoa a pessoa, objetos contaminados, consumo de água ou alimentos contaminados (Estes *et al.*, 2007). As excreções ocorrem em concentrações de até  $10^{12}$  partículas/mL de fezes e a carga viral para causar infecção é de apenas 10 partículas viáveis, mostrando assim a elevada infecciosidade dos RVA. O período médio de incubação da infecção por RVA é dois dias, durante o qual já ocorre a eliminação de partículas viáveis nas fezes do indivíduo contaminado. O quadro agudo da doença apresenta uma duração que pode variar de cinco a sete dias (Estes, 2001). Frequentemente, são observados episódios de diarreia, febre e vômitos, que podem apresentar-se de forma branda ou evoluir para quadros mais graves, levando a desidratação e óbito (Leung *et al.*, 2005).

### 1.2.2 Norovírus (NoV)

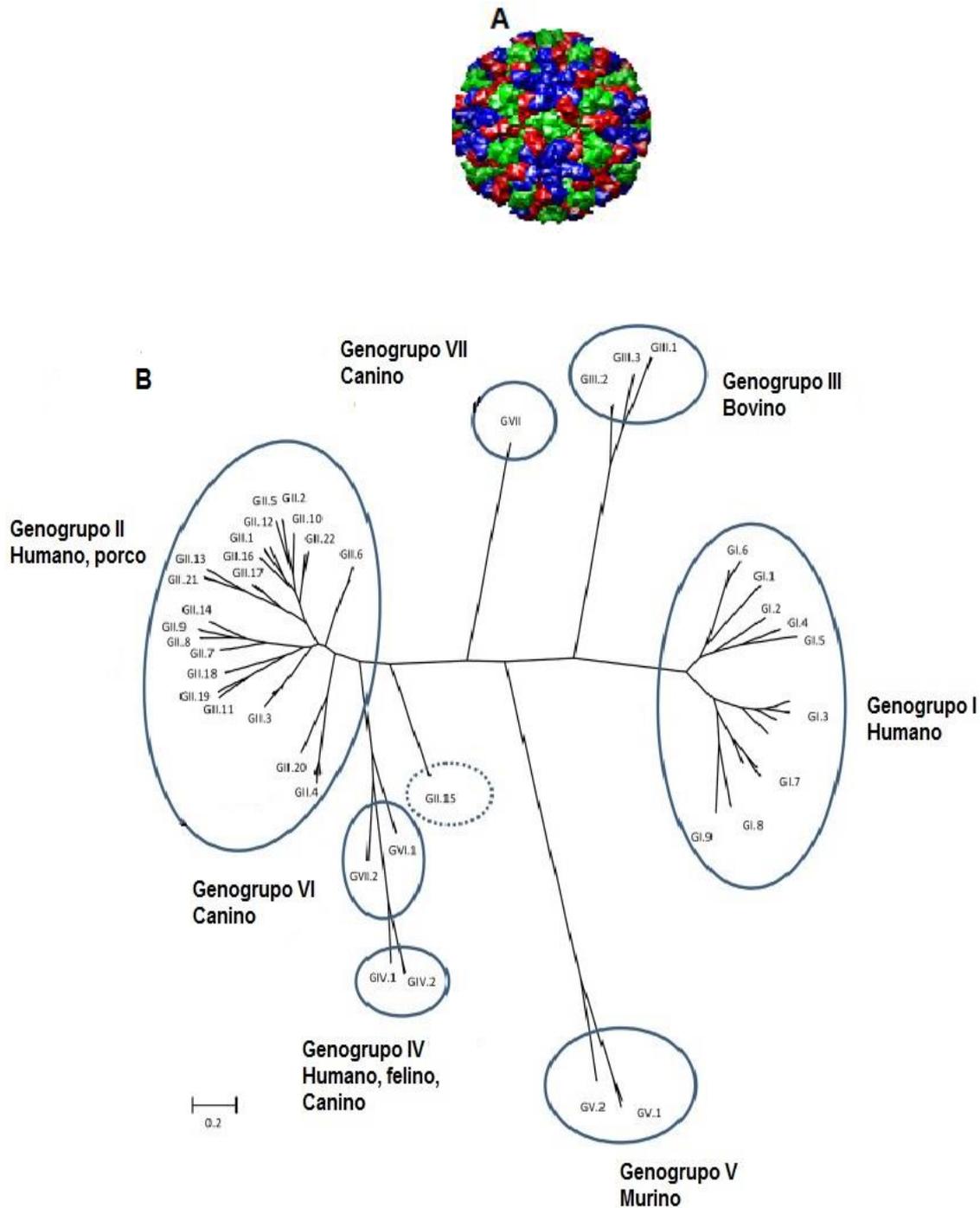
Os NoVs pertencem a família *Caliciviridae*, que compreende os gêneros *Norovirus* (representado pelo *Norwalk virus*), *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus* e o *Nebovirus* (Clarke *et al.*, 2012) e destes, os gêneros *Norovirus* e o *Sapovirus* formam o grupo de calicivírus que infectam humanos (HuCV) (Farkas *et al.*, 2008 e 2010; Tan *et al.*, 2009).

As partículas virais dos NoV são esféricas, medem de 37-40nm de diâmetro, não envelopadas, compostas de um capsídeo (proteína VP1), que apresenta 90 capsômeros dispostos em simetria icosaédrica, como estrutura mais externa. A proteína VP1 é composta de 180 moléculas organizadas em 90 dímeros, que formam dois domínios: S (*shell*) (aa 1 a 225) e P (*protruding*) (aa 226 a 530). O domínio S forma a parte interna do capsídeo que envolve o genoma RNA fita simples (RNAfs) e o domínio P é subdividido em dois domínios: P1 e P2. Estes domínios assumem uma forma semelhante a um cálice, quando visualizados pela microscopia eletrônica (ME) (Prasad *et al.*, 1999; Wilhelmi *et al.*, 2003). O subdomínio P2 é a região mais variável do capsídeo, apresentando a sequência de maior divergência no genoma dos NoV. Esse domínio tem papel importante na maioria das interações com receptores da superfície celular do epitélio intestinal e é o principal sítio de reconhecimento imunológico e de imunogenicidade do virion (Prasad *et al.*, 1999; Nilsson *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2004; Chakravarty *et al.*, 2005; Hardy, 2005).

O genoma do NoV é constituído de um RNAfs, polaridade positiva, com aproximadamente 7,7kb de tamanho e apresenta três regiões de leitura aberta (ORFs). A região ORF1 dos NoV representa 60% do genoma viral e codifica uma poliproteína de cerca de 200 kDa, precursora de 7 proteínas não estruturais (NS1 a NS7), incluindo a RNA polimerase RNA dependente (RdRp), que estão envolvidas na replicação (Prasad *et al.*, 1999; Vinjé, 2015). A ORF2 codifica uma proteína principal de 60 kDa de massa molecular, denominada VP1, que compõe o capsídeo viral. A ORF3 codifica uma proteína estrutural menor (22kDa), denominada VP2, localizada na região 3' do genoma, que regula a expressão da VP1, podendo participar do processo de encapsidação do RNA genômico e montagem do virion (Glass *et al.*, 2000; Hardy, 2005).

Os NoV podem ser classificados em sete genogrupos (GI-GVII), baseando-se na análise da sequência dos nucleotídeos (nt) da região que codifica para a proteína de capsídeo viral (VP1) (Vinjé, 2015). Os genogrupos GI, GII, GIV estão associados à infecção em humanos. Os genogrupos (G) são constituídos de genótipos (GG), que representam a unidade mínima de classificação dos NoV. A classificação para os GG consiste em agrupar os vírus por similaridade de nt (nucleotídeos) e aa (aminoácidos), em determinado ramo de uma árvore filogenética (Ando *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2006). Até o momento, 36 genótipos de NoV foram reconhecidos (Mesquita *et al.*,

2010; Kroneman *et al.*, 2011, 2013). O NoV genogrupo II é o mais detectado mundialmente, com GII.4 prevalente em DD (Figura 2) (Vinjé, 2015).



**Figura 2: Características dos norovírus (NoV).** A- Criomicrografia eletrônica do norovírus murino (MNV-1). B- Classificação dos norovírus em sete genogrupos baseada na

diversidade da sequência completa de aminoácidos da proteína de capsídeo VP1 (Adaptado de Donaldson *et al.*, 2008 e de Vinjé, 2015).

Os NoVs estão em constante evolução, com o surgimento de novas cepas devido ao acúmulo de mutações nucleotídicas pontuais (*drift* antigênico) e a recombinação genética, durante uma coinfecção com pelo menos duas cepas (Bull *et al.*, 2006). Recombinações são frequentes na região de junção ORF1-ORF2 e uma variedade de cepas recombinantes tem sido detectadas em todo o mundo (Chhabra *et al.*, 2010; Eden *et al.*, 2013; Arana *et al.*, 2014).

Um sistema de nomenclatura duplo tem sido proposto, baseado nas sequências da região RNA polimerase (ORF1) e VP1 (Kronemann *et al.*, 2013). Este sistema inclui informações sobre genogrupo, genótipo e para GII.4 o tipo de variante. As cepas são então nomeadas, com o genótipo da polimerase indicado com a letra p em maiúsculo (Kroneman *et al.*, 2011; 2013), como nos exemplos a seguir: Norovirus GII/Hu/US/2010/GIIP12-GII12/HS206 (quando as sequências da polimerase e do capsídeo são conhecidas) ou Norovirus GII/Hu/AU/2012/GII.4Sidney/Melbourne456 (quando somente as do capsídeo são conhecidas) (Kronemann *et al.*, 2013; Vinjé, 2015).

O NoV constituem um dos vírus mais comuns presentes em surtos de DD e representam o segundo agente etiológico de importância clínica, em casos esporádicos, em crianças menores de cinco anos de idade. Com utilização das técnicas de biologia molecular, os NoV têm sido reconhecidos como responsáveis por mais de 90% dos surtos de DD viral no mundo, sendo associados a 1,1 milhões de hospitalizações e 218.000 mortes de crianças de países em desenvolvimento (Patel *et al.*, 2008; Scallan *et al.*, 2011).

São vírus altamente infecciosos, bastando um inóculo de  $10^1$ - $10^2$  partículas para causar a infecção. As manifestações clínicas da infecção pelo NoV são facilmente confundidas com outras viroses gastrointestinais, o diagnóstico diferencial só é possível através da utilização de testes laboratoriais (Turcios *et al.*, 2006).

A prevalência detectada nos casos esporádicos de DD é semelhante entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento. No Brasil, estudos tem demonstrado a ocorrência e a importância deste vírus em casos de DD, com prevalências de 7% a 84,7%, com detecção dos NoV GI e GII, sendo GII o mais detectado, especialmente

o GII.4 (Ferreira *et al.*, 2012; Fioretti *et al.*, 2011; 2014; Aragão *et al.*, 2013; Fumian *et al.*, 2013; de Andrade *et al.*, 2014; Portal *et al.*, 2016; Dábilla *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017). A circulação de cepas recombinantes de NoV também foram demonstradas no Brasil (Fumian *et al.*, 2012, 2016; Hernandez *et al.*, 2016).

Os NoV são altamente infecciosos e sua rota de transmissão é fecal-oral. Disseminam-se principalmente através da ingestão de alimentos e águas contaminadas e transmissão pessoa-a-pessoa, particularmente em lugares de grande aglomeração como creches, escolas, hospitais, navios e águas de recreação (Maunula *et al.*, 2004; Goodgame, 2007, Kroneman *et al.*, 2008).

O período de incubação pode variar de 10 a 51 horas após contato com o vírus (Thornton *et al.*, 2004; Kroneman *et al.*, 2008) e o vírus infeccioso pode ser transmitido não somente durante o período da doença, mas também durante o período de incubação e após a recuperação do indivíduo, com 30% dos casos excretando vírus por até três semanas após a infecção (Koopmans & Duizer, 2004). Assim, pessoas infectadas continuam sendo fontes de infecção após recuperação da doença.

A infecção pode ocorrer de forma assintomática ou com diarreia e vômitos, sendo estas acompanhadas ou não de outras manifestações como cefaleia, febre, mialgia e dores abdominais. As crianças menores de três anos de idade, os idosos e as pessoas imunocomprometidas são as mais gravemente afetadas (Wilhelmi *et al.*, 2003; Thornton *et al.*, 2004; Goodgame, 2006; 2007).

### 1.2.3 *Astrovirus humanos (HAstV)*

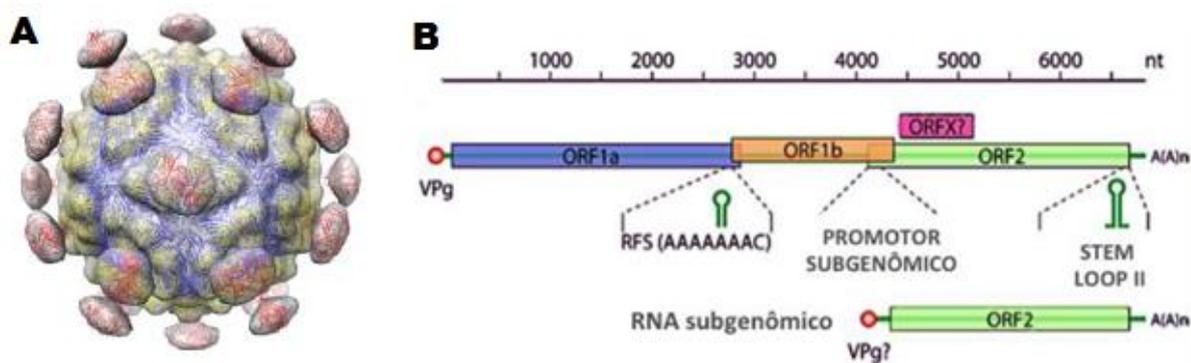
Os HAstV pertencem a família *Astroviridae* que é constituída pelos gêneros: *Mamastrovirus* (astrovírus de mamíferos) e *Avastrovirus* (astrovírus de aves). A classificação aprovada pelo ICTV 2011 divide o gênero *Mamastrovirus* em 19 grupos ou espécies, englobando todos os astrovírus que infectam mamíferos, tanto animais quanto humanos (*Mamastrovirus* 1-19) (Bosch *et al.*, 2014).

As espécies de *Mamastrovirus* (MAstV) associadas à doença em humanos são: *Mamastrovirus* 1 (HAstV clássicos ou HAstV 1-8), *Mamastrovirus* 6 (AstV-MLB1-3), *Mamastrovirus* 8 (AstV-VA2) e *Mamastrovirus* 9 (AstV-HMO e AstV-VA1). Os

HAstV clássicos são prevalentes nos casos de DD em crianças e os não clássicos (HAstV-MLB and HAstV-VA/HMO) foram detectados em crianças com diarreia, mas o papel destes vírus na DD ainda precisa ser investigado (Bosch *et al.*, 2014).

Os HAstV clássicos podem ser classificados, de acordo com a ordem de descrição segundo o sorotipo (HAstV 1-8), baseado na reatividade de anticorpos mono e policlonais com proteínas capsídicas (Oh & Schreier, 2001), ou ainda, segundo o genótipo, com base na sequência nucleotídica de uma região de 382 pb da segunda fase aberta de leitura (ORF-2) (Noel *et al.*, 1995). Análises filogenéticas demonstraram que os sorotipos de HAstV podem ser classificados em 8 genótipos correlacionados aos sorotipos, sendo que os sorotipos HAstV 4 e 8 foram agrupados como genótipo 4 (Oh & Schreier, 2001; Méndez & Arias, 2007).

Os HAstV são vírus pequenos, arredondados, medindo de 70 a 90nm de diâmetro, não apresentam envelope e exibem capsídeo com simetria icosaédrica (Matsui & Greenberg, 2001; Méndez & Arias, 2007). O genoma é constituído por um RNAs de polaridade positiva, de aproximadamente 6.800 nucleotídeos. Contém três ORFs, chamadas ORF-1a, ORF-1b e ORF-2. A ORF-1a e a ORF-1b se encontram na região 5' do genoma e codificam as proteínas não estruturais (NSPs); a ORF-2, localizada na região 3', codifica as proteínas estruturais do capsídeo (Figura 3) (Méndez & Arias, 2007; Bosch *et al.*, 2014).



**Figura 3: Características dos astrovírus humanos (HAstV).** A- Criomicrografia eletrônica do HAstV; B- Diagrama esquemático da organização do genoma do HAstV (Adaptado de Arias & DuBois, 2017 e de Bosch *et al.*, 2014).

Os HAstV são transmitidos principalmente pela via fecal-oral, sendo consideradas várias fontes de contaminação como água destinada para consumo humano, água de piscinas, rios, alimentos marinhos, fômites e principalmente pelo contato pessoa-pessoa em ambientes fechados como creches e asilos (Bosch *et al.*, 2014).

A infecção produzida por estes vírus induz, na maioria das vezes, uma diarreia aquosa e moderada, que dura de dois a três dias e pode vir associada a episódios de vômitos, febre, anorexia, dor abdominal entre outros sinais e sintomas (Maldonado *et al.*, 1998; Matsui & Greenberg, 2001; Walter & Mitchell, 2003; Méndez & Arias, 2007; Bosch *et al.*, 2014). A gravidade da infecção pelos HAstV é considerada menor em relação aos outros agentes entéricos, como os RVA e os NoV, porém o quadro clínico pode ser agravado quando associado ao uso contínuo de antibióticos ou ainda por infecção mista ou imunodeficiência (Matsui & Greenberg, 2001; Wunderl *et al.*, 2011).

O período de excreção do vírus é geralmente curto, variando de três a cinco dias. Nos pacientes idosos e naqueles com deficiência imunológica, a excreção é prolongada, podendo persistir por até tres meses após resolução dos sintomas (Walter & Mitchell, 2003). O HAstV pode ser excretado em concentrações de até  $10^3$  cópias genômicas/g de fezes nos indivíduos infectados (Caballero *et al.*, 2003; Bosch *et al.*, 2014).

Os HAstV são considerados importantes agentes etiológicos associados à DD na infância, sendo responsáveis por cerca de 15.000 óbitos de crianças menores de 5 anos, perdendo somente para os RVA e NoV (Lanata *et al.*, 2013), afetando principalmente as crianças menores de 2 anos (Medina *et al.*, 2000; Guix *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2012; Bosch *et al.*, 2014).

Estes vírus têm sido descritos nas DD em creches, escolas primárias e em ambientes hospitalares em diversas partes do mundo (Leite *et al.*, 1991; Lopez *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001; Walter & Mitchell, 2003; Victoria *et al.*, 2007b; Nguyen *et al.*, 2008; Afrad *et al.*, 2013; Enserink *et al.*, 2015). Estudos epidemiológicos realizados em diferentes países têm demonstrado que a prevalência desses vírus entre crianças varia de 2% a 11% nos países desenvolvidos, e de 0,8% a 28% naqueles em desenvolvimento (Leite *et al.*, 1991; Lew *et al.*, 1991; Lopez *et al.*, 2000; Cunliffe *et al.*,

2002; Basu *et al.*, 2003; Kiulia *et al.*, 2007; Bosch *et al.*, 2014; Xavier *et al.*, 2015; Amaral *et al.*, 2015; Monastiri *et al.*, 2016).

A frequência de detecção dos diferentes HAstV (clássicos) tem sido mostrada, com o HAstV1 mais frequentemente observado em crianças com DD, sendo também detectados os tipos 2, 3, 4 e 5 (Cruz *et al.*, 1992; Lee & Kurtz, 1994; Glass *et al.*, 1996; Mustafa *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004; Mendez-Toss *et al.*, 2004; Marshall *et al.*, 2007; Gabbay *et al.*, 2007a; Guo *et al.*, 2010; Bosch *et al.*, 2014), sendo menos detectados em todo o mundo, os tipos 6, 7 e 8 (Chikhi-Brachet *et al.*, 2002; Walter & Mitchell, 2003; Cunliffe *et al.*, 2002; Guix *et al.*, 2002; Méndez *et al.*, 2002; Victoria *et al.*, 2007a; Gabbay *et al.*, 2007b; Nguyen *et al.*, 2008).

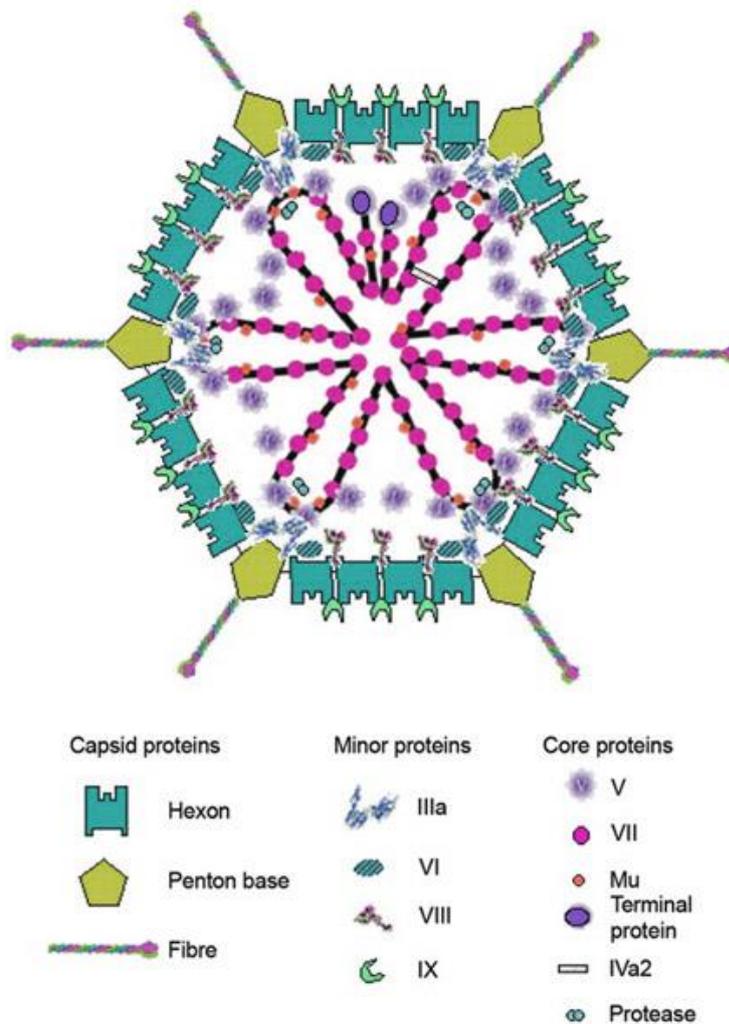
Estudos realizados em diferentes regiões do Brasil, demonstraram a prevalência do HAstV, entre as crianças com DD, variando de 1% a 7,1% (Leite *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2002; Gabbay *et al.*, 2005., 2007a, 2007c; Victoria *et al.*, 2007a; Soares *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2012b; Castro *et al.*, 2015; Xavier *et al.*, 2015), com predominância do HAstV1 (Gabbay *et al.*, 2005, 2007a, 2007c; Victoria *et al.*, 2007a; Soares *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Ferreira *et al.* 2012; Xavier *et al.*, 2015) e detecção também dos outros HAstV clássicos (Gabbay *et al.*, 2005; 2007a; 2007b; Victoria *et al.*, 2007a; Soares *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Xavier *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2015; Xavier *et al.*, 2015).

#### 1.2.4 Adenovírus humanos (HAdV)

Os HAdV pertencem a família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus*, estão agrupados em 7 espécies designados de A a G (Ghebremedhin, 2014) e com 78 tipos descritos até o momento (Human Adenovirus Working Group). São vírus não envelopados, capsídeo de configuração icosaédrica e possuem entre 70-100 nm de diâmetro. O capsídeo é constituído por 252 capsômeros, 240 hexons que formam as 20 faces triangulares do icosaédro e 12 pentons que formam os 12 vértices do icosaédro. Da base de cada penton sai uma projeção filamentosa denominada de fibra, que varia em número de acordo com a espécie. O genoma do HAdV é composto por DNA fita dupla, linear e não segmentado. A sequência de DNA viral é bastante conservada entre todos os adenovírus, e codifica proteínas estruturais, além de

proteínas envolvidas na replicação do DNA e montagem do vírus (Ghebremedhin, 2014).

O vírion dos HAdV é composto de aproximadamente 87% de proteínas (Green & Pina, 1963). O DNA codifica, no mínimo, 35 proteínas estruturais e não estruturais, das quais 11 estão contidas no vírion. Sete polipeptídeos, II, VI, VIII, IX, III, IIIa e IV identificados como formadores do capsídeo viral e cinco polipeptídeos V, VII, X (clivada na proteína  $\mu$ , presente somente no vírion), TP (proteína terminal) e p23 (protease) no core. Cada hexon é formado por 3 cópias do polipeptídeo II. Os polipeptídeos IIIa, VI, VIII e IX são constituintes do capsídeo e estão associados ao hexon. Cada capsômero penton é formado por cinco cópias do polipeptídeo III. A fibra é uma glicoproteína formada de três cópias do polipeptídeo IV. Dois polipeptídeos, V e o VII, são proteínas do core ligadas ao DNA (Figura 4) (Horwitz, 2001; Smith *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2011; Lion, 2014).



**Figura 4: Estrutura tridimensional do adenovírus humano (HAdV).** Obtida por uma combinação de microscopia eletrônica e cristalografia de raio-x, mostrando as diferentes proteínas do virion (adaptado de Russel, 2009).

Os HAdV são reconhecidos como agente etiológico de uma variedade de síndromes clínicas (Rezig *et al.*, 2006), incluindo DD, doença respiratória, conjuntivite, cistite hemorrágica e exantema (Horwitz, 2001; Ghebremedhin, 2014).

Os HAdV frequentemente associados à DD são os sorotipos HAdV-40 e HAdV-41 pertencentes a espécie F (também denominados entéricos). Os HAdV-F possuem tropismo entérico e são considerados de grande importância na etiologia das DD em crianças (Tiemessen & Kidd, 1995). Os sorotipos HAdV-12, -18 e -31 da espécie A, HAdV-3, -7 e -50 da espécie B, HAdV- 1, -2 e -5 da espécie C, HAdV-31 e -51 da

espécie D e HAdV-52 espécie G (Magwalivha *et al.*, 2010; Ghebremedhin, 2014) também têm sido detectados em DD.

A transmissão dos HAdV pode ocorrer pela via fecal-oral, através de água ou alimentos contaminados e transferências indiretas através do contato com superfícies contaminadas (Boone & Gerba, 2007). Os HAdV-F podem ser responsáveis por uma doença branda, quando comparada com a infecção causada por RVA, mas com um período de incubação entre 3 e 10 dias, diarreia, mas prolongada (10 dias) e, febre e vômitos menos graves (Wood *et al.*, 1988; Qiao *et al.*, 1999). Os HAdV-F, causam diarreias graves, principalmente em crianças, constituindo um importante papel na epidemiologia desta doença (Parashar *et al.*, 2003). Estes vírus são responsáveis por DD em crianças e adultos e não apresentam sazonalidade definida, podendo ser detectado ao longo de todo ano (Ison, 2006).

Os HAdV-F são importantes agentes etiológicos nas infecções esporádicas e em surtos de DD em lactentes e crianças menores de cinco anos de idade, em creches, jardins de infância e hospitais (Akihara *et al.*, 2005; Sumi *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2007; Sanaei *et al.*, 2016).

Estudos realizados em todo mundo, demonstram que os HAdV são responsáveis por DD em crianças em 0,7% a 38% dos casos, sendo os HAdV-F (40/41) associados à esse quadro em 2% a 94,4% das amostras positivas (Uhnnoo *et al.*, 1984; Herrmann *et al.*, 1988; Moore *et al.*, 2000; McIver *et al.*, 2001; Saderi *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2003; Verma *et al.*, 2009; Sdiri-Loulizi *et al.*, 2009; Lekana-Douki *et al.*, 2015; La Rosa *et al.*, 2015; Quédrago *et al.*, 2016).

No Brasil, estudos realizados em crianças menores de cinco anos de idade com DD, demonstraram a presença do HAdV em 0,8% a 35% dos casos (Leite *et al.*, 1985; Hársi *et al.*, 1995; Soares *et al.*, 2002; Filho *et al.*, 2007; Andreasi *et al.*, 2008; Amaral *et al.*, 2015), sendo os HAdV-F40/41 prevalentes em 31,8% a 76,6% dos casos positivos (Leite *et al.*, 1985; Hársi *et al.*, 1995; Soares *et al.*, 2002; Filho *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2016).

No Brasil, poucos estudos demonstraram a detecção dos HAdV, principalmente os HAdV-F nos casos de DD em crianças, demonstrando assim, a necessidade de estudos epidemiológicos e moleculares sobre estes vírus nas amostras brasileiras.

## 1.3 VÍRUS EMERGENTES

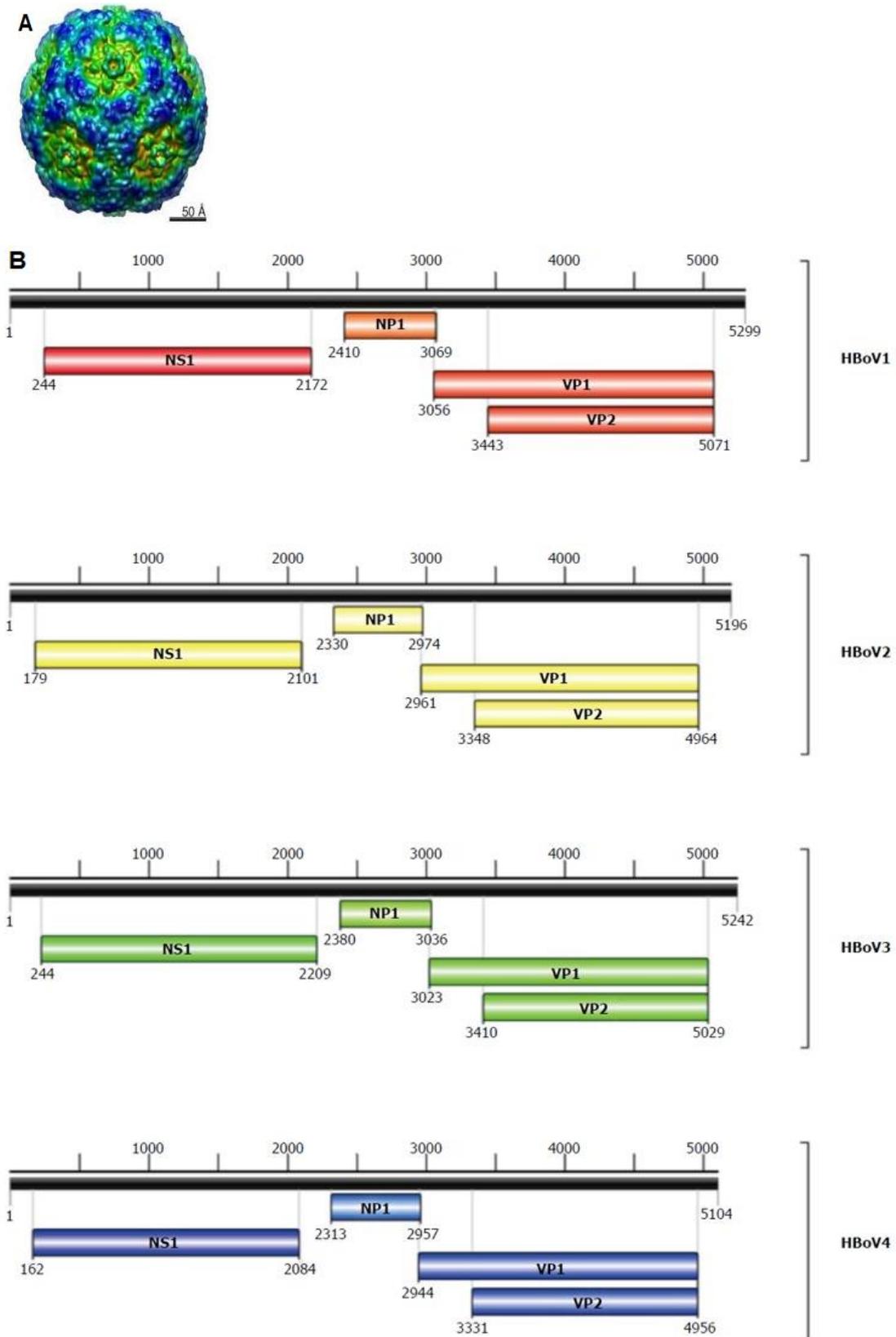
### 1.3.1 *Bocavírus humanos (HBoV)*

A descoberta do bocavírus humano (HBoV) foi o resultado de um estudo metagenômico, a partir de secreções de nasofaringe obtidas de crianças com infecções do trato respiratório inferior (ITRI), na Suécia, por Allander e colaboradores (2005).

O HBoV foi classificado na família *Parvoviridae*, sub-família *Parvovirinae* e gênero *Bocavirus* (Allander *et al.*, 2005), devido a sua organização genética e homologia de sequências com outros membros do gênero *Bocavirus*, como os parvovirus bovino e o vírus mínimo canino. O nome “bocavírus” é derivado da combinação “bo” (de bovino) e “ca” (de canino).

Os membros da família *Parvoviridae* não possuem envelope, apresentam um capsídeo de configuração icosaédrica, possuindo entre 18 - 26nm de diâmetro, e contém um DNA linear fita simples. O genoma do HBoV é organizado em 3 ORFs, com 2 (ORF1 e ORF2) codificando as proteínas não estruturais (NS1 e NP1) e uma (ORF3) codificando 2 proteínas de capsídeos (VP1 e VP2) (Figura 5) (Guido *et al.*, 2016).

Os HBoV estão classificados em quatro genótipos: HBoV1, HBoV2, HBoV3 e HBoV4. O HBoV1, vírus originalmente descrito por Allander e colaboradores (2005), tem sido associado principalmente à infecção respiratória aguda, mas também tem sido detectado em DD (Chow & Esper, 2009; Schildgen, 2013; Guido *et al.*, 2016). O HBoV2 foi primeiramente detectado em fezes de crianças paquistanesas, com Parálise Flácida Aguda (PFA), pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers randômicos (Kapoor *et al.*, 2009). Estudos subsequentes, demonstraram que o HBoV 2 raramente ocorre em secreções respiratórias, porém é frequentemente detectado nas fezes de crianças e adultos com sintomas gastrointestinais (Arthur *et al.*, 2009; Chow *et al.*, 2010; Paloniemi *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014), e forneceram evidências para a associação dos HBoV2 à DD (Arthur *et al.*, 2009; Chow *et al.*, 2010). O HBoV2 e um terceiro vírus (HBoV3) também foram identificados em fezes de crianças com e sem DD, na Austrália (Arthur *et al.*, 2009).



**Figura 5: Características dos bocavírus humano (HBoV).** A- Criomicrografia eletrônica do bocavírus humano (HBoV). B- Diagrama esquemático da organização do genoma do BoV (Adaptado de Guido *et al.*, 2016).

O HBoV4, também foi detectado em fezes de crianças com PFA, pela PCR utilizando iniciadores que possibilitavam a detecção dos quatro HBoV (Kapoor *et al.*, 2010).

O modelo de transmissão dos HBoV ainda não está completamente estabelecido. O HBoV tem sido detectado nas secreções respiratórias, em aerossol, fezes, urina, soro e linfonodo (Chow & Esper, 2009). Os vírus entram no hospedeiro através do trato respiratório e, através da corrente sanguínea ou por ingestão direta, chegam ao trato gastrointestinal. Acredita-se assim, que a transmissão viral possa ocorrer através da via oral ou fecal-oral (Schilgen, 2013). Este modelo de patogênese é corroborado pelo fato de que, a soroprevalência de HBoV é maior para o vírus respiratório HBoV1, enquanto que HBoV2-4 são menos frequentes e menos soroprevalentes (Kantola *et al.*, 2011).

Devido à falta de um sistema de cultura de células e de infecção utilizando modelo animal, o diagnóstico do HBoV é, exclusivamente, baseado em métodos de detecção molecular, principalmente pela PCR e a PCR quantitativa (qPCR) (Schilgen *et al.*, 2008; Guido *et al.*, 2016). Desta maneira, o HBoV tem sido detectado em crianças e adultos com infecção respiratória aguda (IRA) e DD na Europa (Allander *et al.*, 2005; Guido *et al.*, 2011; Rimoldi *et al.*, 2011; La Rosa *et al.*, 2016), Ásia (Lau *et al.*, 2007; Khamrin *et al.*, 2012 a,b; Alam *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017), África (Kapoor *et al.*, 2010), Austrália (Arthur *et al.*, 2009) e nas Américas (Proença-Modena *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2010; Chhabra *et al.*, 2013).

Os sintomas gastrointestinais mais comuns incluem náuseas, vômitos e diarreia (Lau *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2008) e altas taxas de coinfeções com outros patógenos intestinais já foram descritas (Albuquerque *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Vicente *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008; Mitui *et al.*, 2014; Alam *et al.*, 2015; Guido *et al.*, 2016, Zhou *et al.*, 2017).

No Brasil, o HBoV foi detectado em crianças com DD com prevalência que variou entre 2% a 41,9% e altas taxas de coinfeções (21,4% a 31,8%) com outros vírus entéricos (Albuquerque *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2016).

A presença do HBoV tem sido confirmada nas IRA e nas DD, mas o verdadeiro papel do HBoV nestas infecções ainda não foi determinado. Os HBoV1, HBoV2, HBoV3 e HBoV4 têm sido detectados nas amostras fecais de pacientes com DD, contudo, mais estudos são necessários para determinar a epidemiologia, a

associação à doença e caracterização genética destes vírus em todo mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, inclusive no Brasil.

### 1.3.2 *Aichivírus (AiV-1)*

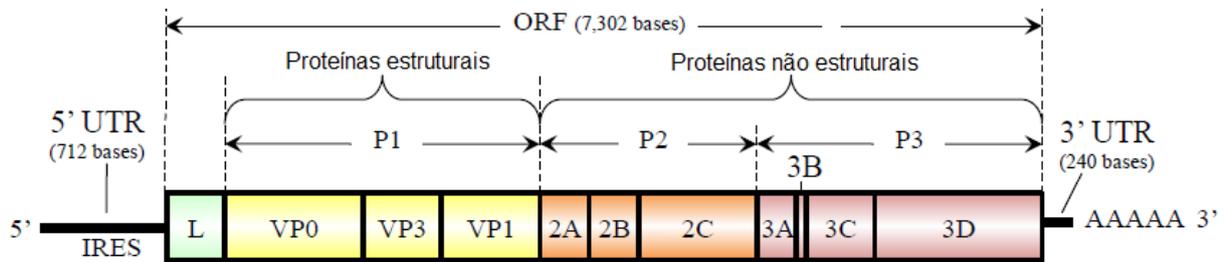
O AiV-1 foi detectado a primeira vez em 1989, em amostras fecais obtidas de pacientes envolvidos em surtos de DD associado ao consumo de ostras, na Prefeitura de Aichi, Japão (Yamashita *et al.*, 1991). Estudos subsequentes, demonstraram a presença do AiV-1 em outros cinco surtos de DD, também associados ao consumo de ostras (Yamashita *et al.*, 1993). Yamashita e colaboradores (1995), detectaram o AiV-1 em amostras fecais obtidas de crianças paquistanesas com DD e de turistas japoneses que desenvolveram DD, depois de terem viajado para países do sudeste da Ásia. Entretanto, somente oito anos após a primeira detecção dos AiV-1, foram definitivamente classificados, pela análise genética, como um novo membro pertencente a família *Picornaviridae* (Yamashita *et al.*, 1998) e gênero *Kobuvirus*. Este gênero é composto por três espécies, nomeadas, Aichivirus A, Aichivirus B e Aichivirus C, e anteriormente chamadas de Aichi virus/Aichivirus, kobuvirus bovino e kobuvirus suíno, respectivamente (Adams *et al.*, 2013).

A espécie Aichivirus A é constituída por três membros geneticamente distintos: AIV-1 (Aichivirus em seres humanos) (Yamashita *et al.*, 1991), kobuvirus canino 1 (Kapoor *et al.*, 2011) e kobuvirus murino 1 (Phan *et al.*, 2011). O AiV-1 foi classificado em três genótipos distintos: A, B e C com base em sequências nucleotídicas da região de junção 3C/3D (Yamashita *et al.*, 2000; Ambert-Balay *et al.*, 2008; Reuter *et al.*, 2011). Preliminarmente, os dados publicados sugeriram que genótipo A podia ser comum na Europa e Ásia, o B na América, Ásia e Europa e o C na África (Ambert-Balay *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2006; Pham *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2000).

O AiV-1 tem sido demonstrado como causa de DD em humanos, tendo como principais sintomas diarreia, dor abdominal, náusea, vômito e febre (Yamashita *et al.*, 1991; 2001).

O AiV-1 não apresenta envelope, exhibe capsídeo com simetria icosaédrica e seu genoma é constituído por um RNAfs de polaridade positiva, de aproximadamente 8.300 nucleotídeos. O genoma compreende uma região 5' não traduzida (UTR- do inglês *untranslated region*), com um sítio de acesso interno para o ribossoma (IRES-

do inglês *internal ribosome entry sites*), uma grande ORF que codifica uma poliproteína de aproximadamente 7.300 nucleotídeos e uma região 3' não traduzida. A poliproteína é clivada em proteínas estruturais P1 (VP0, VP3 e VP1), proteínas não estruturais P2 (2A, 2B e 2C) e P3 (3A, 3B, 3C e 3D) (Figura 6) (Yamashita *et al.*, 1998, 2003; Sasaki *et al.*, 2001; Reuter *et al.*, 2011; Kitajima & Gerba, 2015).



**Figura 6: Organização genômica do aichivírus 1 (AiV-1).** (Adaptado de Kitajima & Gerba, 2015).

O AiV-1 tem uma distribuição mundial, com detecção em DD na Ásia (Yamashita *et al.*, 1995; Pham *et al.* 2007, 2008; Yang *et al.*, 2009), Europa (Oh *et al.*, 2006; Ambert-Balay *et al.*, 2008; LeGuyader *et al.*, 2008; Reuter *et al.*, 2009; Kaikkonen *et al.*, 2010; Räsänen *et al.*, 2010), África (Sdiri-Loulizi *et al.*, 2009; 2010) e América (Oh *et al.*, 2006). Além disso, estudos de soroprevalência realizados na Alemanha França, Espanha e Tunísia, demonstraram uma alta prevalência (80% a 99%) de anticorpos contra o vírus em adultos (Oh *et al.*, 2006; Goyer *et al.*, 2008; Ribes *et al.*, 2010 Sdiri-Loulizi *et al.*, 2010).

Em casos esporádicos de DD, este vírus tem sido detectado em amostras fecais em percentuais entre 0,5% a 4,1% (Pham *et al.*, 2007; Ambert-Balay *et al.*, 2008; Sdiri-Loulizi *et al.*, 2009; Reuter *et al.*, 2009; Kaikkonen *et al.*, 2010). No entanto, em surtos de DD, após consumo de ostras, por exemplo, uma alta prevalência do AiV-1 (20% a 32%) já foi reportada (Yamashita *et al.*, 2000; Ambert-Balay *et al.*, 2008).

No Brasil, o AiV-1 genótipo B, foi detectado em amostras fecais obtidas de crianças brasileiras com DD (Oh *et al.*, 2006) e, na Região Centro-Oeste, este vírus foi detectado somente em coinfeção (Souza *et al.*, 2012).

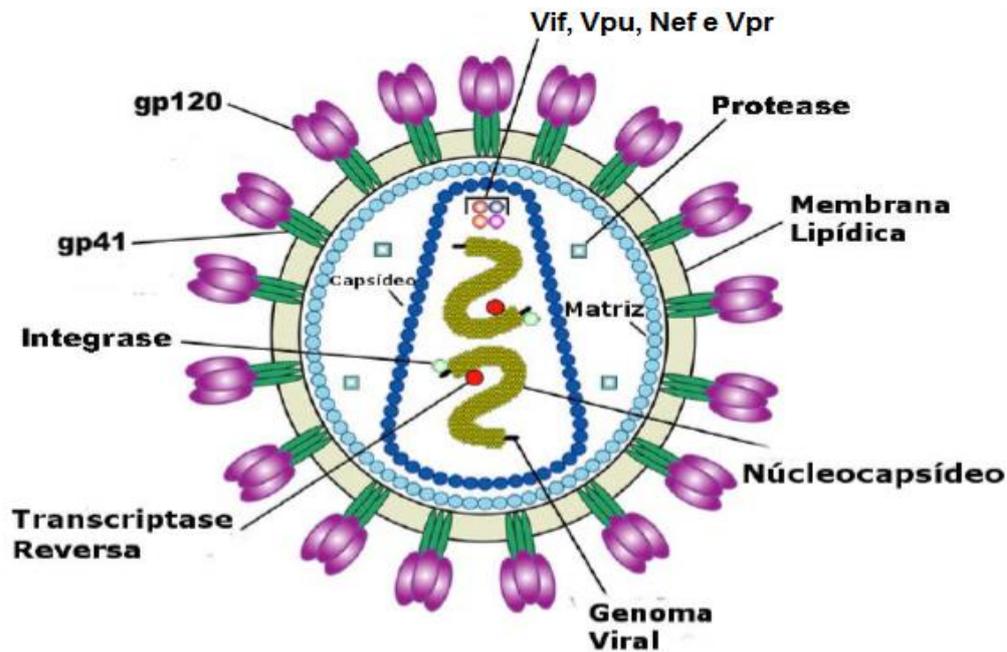
## 1.4 DOENÇA DIARREICA EM PACIENTES SOROPOSITIVOS PARA O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV-1)

### 1.4.1 Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) e a doença diarreica

A infecção pelo vírus HIV-1 pode afetar todo o trato gastrointestinal e o sistema hepatobiliar (Edwards *et al.*, 1990), determinando a falência progressiva das funções fisiológicas e imunológicas do trato gastrointestinal (McGowan *et al.*, 1997; Elfstrand & Florén 2010).

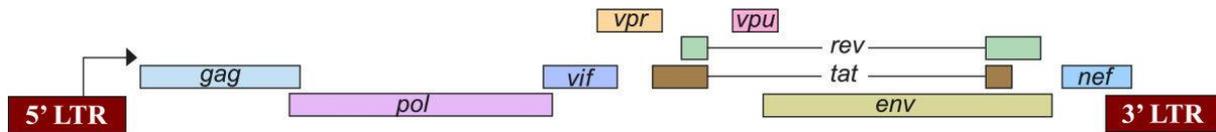
O HIV-1 é membro da família Retroviridae do gênero Lentivirus, seu material genético é composto por RNA e pela transcriptase reversa. Cada partícula viral possui duas cópias de RNA, uma delas é retrotranscrita em cDNA, pela ação da enzima transcriptase reversa, e então integrado ao genoma, pela ação da integrase e por fim, denominado de provírus (Nájera *et al.*, 1987; Goto *et al.*, 1994; Freed, 2001). O provírus serve como molde para a produção da sua progênie viral utilizando a maquinaria de transcrição do hospedeiro, ou pode entrar em latência (Archin *et al.*, 2014).

A partícula viral apresenta cerca de 110 nm de diâmetro, com simetria icosaédrica. Em sua parte mais externa, o HIV apresenta envelope oriundo da membrana plasmática da célula hospedeira (Burton, 2006). No envelope viral encontram-se ancoradas as glicoproteínas gp120 (superfície) e gp41 (transmembranar), importantes no reconhecimento e interação com a célula hospedeira. Internamente temos: a matriz viral (p17) envolvendo o capsídeo (Fanales-Belasio *et al.*, 2010), o RNAfd envolto no nucleocapsídeo e as proteínas virais (protease, integrase, transcriptase reversa, Nef, Vif, Vpu e Vpr) (Figura 7).



**Figura 7: Representação da partícula viral do Vírus da imunodeficiência humana (HIV)** (adaptado de National Institute of Allergy and Infectious Diseases [NIAID], 2005).

O genoma do HIV-1 consiste de RNAfd de polaridade positiva de aproximadamente 9,7Kb, composto por nove genes (Figura 10). Três genes classificados como genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), dois como genes reguladores (*tat* e *rev*) e quatro como genes acessórios (*nef*, *vif*, *vpu* e *vpr*), sendo responsáveis pela estrutura viral, regulação do ciclo e modulação de proteínas da célula hospedeira. Os genes estruturais são responsáveis pela codificação de genes imprescindíveis para a estruturação da partícula viral, além de auxiliarem importantes etapas do ciclo replicativo. O gene *gag* codifica as proteínas do capsídeo (p24), nucleocapsídeo (p7), matriz (p17) e p6. O gene *pol* codifica as enzimas virais PR (Protease), RT (transcriptase reversa) e INT (integrase) e o gene *env* codifica as proteínas gp120 e gp41 (Figura 8) (de Groot & Bontrop, 2013).



**Figura 8: Organização do DNA proviral do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1).**

No DNA proviral são observados 9 genes virais as sequências repetitivas-LTRs- que não codificam proteínas, porém são responsáveis pelo início e regulação da replicação viral (de Groot & Bontrop, 2013).

O HIV apresenta grande diversidade genética, resultado do somatório de diversos fatores e características moleculares do vírus e de sua origem, tais como produção viral, taxa de erro da transcriptase reversa e de recombinação, hipermutações e origem zoonótica. Com base nas distintas origens zoonóticas e nas sequências de genomas completos, o HIV pode ser classificado em dois tipos: HIV-1 e HIV-2. O HIV-2 é menos patogênico e endêmico na África e o HIV-1 é responsável pela pandemia mundial do HIV (Rajarapu, 2014).

O HIV é transmitido por contato sexual, transfusão de sangue, sêmen, secreção vaginal e leite materno. As células do sistema imune humano como os linfócitos T, macrófagos e células dendríticas, são alvo da infecção pelo HIV, pois elas expressam em sua superfície moléculas responsáveis pela adsorção viral como receptor CD4 (Dalgleish *et al.*, 1984) e o correceptores CCR5 e CXCR4 (Moore *et al.*, 1997).

A história natural da infecção pelo HIV se caracteriza por 3 fases: fase aguda, fase de latência clínica e fase de AIDS. A fase aguda é caracterizada por um pico de viremia, paralelo a um decréscimo de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que ocorre cerca de 3-4 semanas após a aquisição do vírus. Seguido a esse pico, ocorre o progressivo aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e diminuição da carga viral, causados pela montagem da resposta imune inicial contra o vírus. Cerca de 6 a 12 meses após a infecção, ocorre uma recuperação dos níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e declínio da carga viral até um ponto basal denominado setpoint viral (Kassuto & Rosenberg, 2004). A partir do estabelecimento do setpoint viral, se inicia um período de latência clínica (ou período assintomático), caracterizado na maioria dos indivíduos por um progressivo declínio de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e aumento da viremia durante anos, culminando na fase de AIDS,

na qual a depleção massiva de células TCD4<sup>+</sup> deixa o organismo vulnerável a infecções oportunistas e pode levar o indivíduo a morte na ausência de tratamento.

Os pacientes HIV-1 soropositivos com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) frequentemente apresentam-se com diarreia e esta condição nestes pacientes é um grande desafio, porque além das etiologias comuns à população em geral, deve-se considerar as manifestações clínicas não infecciosas, incluindo reação às drogas antiretrovirais. Os inibidores da protease e da transcriptase reversa são os mais fortemente associadas à diarreia (Dikman *et al.*, 2015).

A diarreia é considerada uma importante causa de mortalidade e morbidade entre os pacientes HIV-1/AIDS, sendo a segunda causa mais comum, nos países em desenvolvimento afetando aproximadamente 90% dos pacientes com AIDS (Attili *et al.*, 2006; Dwivedi *et al.*, 2007; Chawla & Ichhpujani, 2011).

A etiologia da diarreia nestes pacientes pode ser dividida em duas grandes categorias: não infecciosa e infecciosa (Dikman *et al.*, 2015). A diarreia infecciosa representa uma grande preocupação, uma vez que este grupo é suscetível a patógenos clássicos e a diferentes agentes oportunistas (Villamor *et al.*, 2004; Rossit *et al.*, 2009; Elfstrand & Florén, 2010), que junto à desnutrição pode levar os pacientes soropositivos a óbito (Villamor *et al.*, 2004; Tesfamariam *et al.*, 2016).

A diarreia não infecciosa pode ser atribuída a doenças gastrointestinais malignas, enteropatia associada ao HIV, ao uso de medicamentos ou ser considerada idiopática, quando a causa não é determinada. Além disso, pode ser considerada como multifatorial, sendo comumente observada também a má absorção de gorduras, independentemente do uso de terapia antirretroviral altamente ativa- HAART (Griffin, 1990; Grunfeld & Feingold, 1992; Sherman & Fish, 2000; Poles *et al.*, 2001; Dikman *et al.*, 2015). No entanto, a diarreia não infecciosa para a maioria dos pacientes pode ser limitada a um período de um a dois meses (Niyogi *et al.*, 1994). Por outro lado, há pacientes que requerem uma maior atenção, uma vez que uma baixa de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ( $\geq 200$  células/mm<sup>3</sup>) causa uma maior susceptibilidade para a forma infecciosa (Weber *et al.*, 1999; De Oliveira-Silva *et al.*, 2007; Tesfamariam *et al.*, 2016; Swathirajan *et al.*, 2017).

A introdução da HAART tem reduzido as prevalências de infecções gastrointestinais, mas os patógenos tais como: vírus, parasitos e bactérias, ainda são

frequentemente associados a essas infecções em pacientes infectados pelo HIV-1 (Mönkemuller & Wilcox, 2000; Vizzi & Angulo Medina, 2013).

Os vírus gastroentéricos têm sido detectados em pacientes HIV-1 soropositivos em proporções que variam dependendo da origem, idade e tamanho da população do estudo, o estado de imunossupressão do paciente e o método de detecção utilizado (Vizzi & Angulo Medina, 2013). Em geral o percentual de detecção de pelo menos um vírus entérico, varia de 6,4-52% em indivíduos infectados pelo HIV na Venezuela (González *et al.*, 1998; Liste *et al.*, 2000) e de 20 a 35% nesta população na Argentina e nos Estados Unidos (Giordano *et al.*, 1999; Grohmann *et al.*, 1993).

O diagnóstico molecular e, em consequência o tratamento específico, tem resultado em declínio de algumas infecções como por citomegalovírus (CMV) e candidíase esofágica nestes pacientes. No entanto, a DD ainda é um grande desafio nos pacientes HIV-1 soropositivos, devido ao dano causado pelo HIV-1 no trato gastrointestinal, da utilização de terapias medicamentosas, da alteração do sistema imunológico e da contínua emergência de novos patógenos. Assim, para estabelecimento de um tratamento específico, o conhecimento destes agentes torna-se imprescindível.

#### *1.4.2 Vírus gastroentéricos e emergentes em pacientes HIV-1 soropositivos, no mundo*

Os primeiros estudos, visando a detecção de vírus entéricos nas DD em pacientes com AIDS, privilegiaram somente a detecção de RVA e HAAdV (Saulsbury *et al.*, 1980; Cunningham *et al.*, 1988; Laughon *et al.*, 1988; Kaljot *et al.*, 1989) e mostraram baixa prevalência destes vírus entre estes pacientes.

Posteriormente, estudos realizados em diferentes países, mostraram a detecção de RVA entre os adultos HIV-1 soropositivos, com frequência de 0% a 18% (Giordano *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999; Albrecht *et al.*, 1993; Gassama *et al.*, 2001) e entre as crianças HIV-1 soropositivas com frequências de 0% a 38% (Pavia *et al.*, 1992; Grohmann *et al.*, 1993; Oshitani *et al.*, 1994; Guarino *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.* 1998; Cunliffe *et al.*, 2001; Rossit *et al.*, 2007; Nakawesi *et al.*, 2010; van Eijk *et al.*, 2010). Estas frequências foram iguais ou menores, quando comparadas as frequências entre as crianças HIV-1 soronegativas (Pavia *et al.*, 1992; Oshitani *et*

*al.*, 1994; Guarino *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 1998; Cunliffe *et al.*, 2001; Rossit *et al.*, 2007).

Uma alta prevalência de RVA foi demonstrada entre as crianças HIV-1 soropositivas menores de dois anos de idade, no entanto a infecção pelo RVA não foi mais frequente em diarreias (Fontana *et al.*, 1997). A epidemiologia do RVA e sua associação com diarreia não varia significativamente durante a infecção por HIV-1 (Liste *et al.*, 2000).

Em um estudo com crianças HIV-1 soropositivas em Nairobi, Quênia, os RVA foram os mais prevalentes entre as crianças HIV-1 soropositivas com diarreia (23,3%) do que as sem diarreia (2%), sendo o RVA G3P[6] o mais prevalente (30,4%), seguido pelos genótipos G1P[6] (8,6%), G1P[8] (8,6%), G8P[6], G8P[4], G3P[8], G9P[4], G4P[6] G4P[4] (4,3% de cada genótipo) (Kiulia *et al.*, 2009).

Entre as crianças e adultos HIV-1 soropositivos, foi demonstrada uma grande variação na detecção do NoV (6% a 51%) (Grohmann *et al.*, 1993; González *et al.*, 1998; Liste *et al.*, 2000; Rodriguez-Guillén *et al.*, 2005), no entanto esta variação parece estar associada ao método utilizado para detecção destes vírus.

Um estudo prévio reportou que os NoV foram mais frequentes entre crianças (39%) do que adultos (12%) e que, as crianças HIV-1 soropositivas foram mais acometidas (51%) do que as soronegativas. No entanto, o NoV GII foi o genótipo detectado, tanto em crianças quanto nos adultos (Rodriguez-Guillén *et al.*, 2005).

Na África, o NoV foi detectado em 17% a 21,2% das crianças HIV-1 soropositivas, com o predomínio do genótipo GII (Mans *et al.*, 2014; Moyo *et al.*, 2014c) e foi associado aos óbitos destas crianças com DD (Page *et al.*, 2017).

Alguns estudos atribuem aos HAstV um papel relevante na etiologia da DD em adultos com HIV-1, com uma frequência de 12% entre os pacientes HIV-1 soropositivos e de 0% a 2, entre os pacientes soronegativos (Grohmann *et al.*, 1993; Liste *et al.*, 2000). No entanto, estudos realizados na Venezuela e Argentina, mostraram uma baixa frequência de HAstV em pacientes com HIV-1/AIDS e não foram significativamente associados à DD (González *et al.*, 1998; Giordano *et al.*, 1999).

Vários estudos, realizados a partir da década de 90, em adultos e crianças HIV-1 soropositivos com DD, detectaram o HAstV em prevalências que variaram entre 0% a 50% (Grohmann *et al.*, 1993; Durepaire *et al.*, 1995; González *et al.*, 1998; Giordano *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999; Liste *et al.*, 2000; Treviño *et al.*, 2001; Curlin *et al.*,

2010; Silva *et al.*, 2010; Morillo *et al.*, 2010; Moyo *et al.*, 2014b) e os HAdV entéricos (HAdV-F40 e 41) foram somente detectados em pacientes com HIV-1 soropositivos com DD crônica (Grohmann *et al.*, 1993; Dionisio *et al.*, 1997; Giordano *et al.*, 1999).

O HBoV foi descrito como possível agente causador de DD em 2009, sendo o terceiro vírus mais detectado em crianças australianas com DD (Arthur *et al.*, 2009). Os HBoVs 2, 3 e 4 têm sido detectados em fezes, sugerindo um tropismo do HBoV para o intestino (Arthur *et al.*, 2009; Chow *et al.*, 2010; Kapoor *et al.*, 2010) e, até o momento, somente estudos brasileiros mostraram a detecção do HBoV em pacientes com HIV-1/AIDS. Porém, estudos são necessários para melhor avaliar o papel e a prevalência do HBoV em pacientes imunossuprimidos com DD, no Brasil.

Um estudo prévio também reporta a detecção do AiV-1 em adultos HIV-1 soropositivos, sendo este agente detectado em 20% das amostras estudadas (Oude *et al.*, 2014).

#### *1.4.3 Vírus gastroentéricos e emergentes em pacientes HIV-1 soropositivos, no Brasil*

No Brasil, estudos prévios avaliaram a presença do RVA em crianças e/ou adultos HIV-1 soropositivos, com ou sem DD e, apesar de, na maioria dos casos o vírus não ter sido detectado (Machado *et al.*, 1996; Rossit *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010; Gabbay *et al.*, 2001), o genótipo G4P[8] foi aquele detectado nos casos positivos (Morillo *et al.*, 2010).

O NoV também já foi detectado em adultos HIV-1 soropositivos (Gonçalves *et al.*, 2009), apesar de nem sempre estar presente nesta população (Silva *et al.*, 2010). Já em gestantes, o vírus foi detectado em pacientes com ou sem HIV-1 (Ferreira *et al.*, 2010).

O HAsV foi detectado entre adultos HIV-1 soropositivos (Gabbay *et al.*, 2001, Gonçalves *et al.*, 2009, Silva *et al.*, 2010) e entre as crianças, este vírus foi detectado em 11% daquelas sem diarreia (Rossit *et al.*, 2007).

A detecção do HAdV nas DD entre pacientes com HIV-1/AIDS (Morillo *et al.*, 2010, Silva *et al.*, 2010) também já foi investigada, porém nenhum estudo brasileiro avaliou a presença dos HAdV entéricos (F40 e 41) nesta população.

Por outro lado, até o momento, somente estudos brasileiros, investigaram a presença do HBoV em amostras de pacientes HIV-1 soropositivos, com DD. O vírus foi identificado em criança HIV-1 soropositiva, entre adultos HIV-1/AIDS positivos com DD e em coinfeções com outros patógenos entéricos (Albuquerque *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010).

Até o momento, não existem estudos demonstrando a presença do AiV-1 em crianças HIV-1 soropositivas com DD.

## 2 JUSTIFICATIVA

A DD constitui a segunda maior causa de mortalidade em crianças menores de cinco anos, sendo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento (Fontaine *et al.*, 2009).

Os vírus, em particular, têm sido reconhecidos como principais causadores de DD, principalmente os entéricos (RVA, NoV, HAstV e HAdV), que são frequentemente associados a casos esporádicos e surtos, acometendo todas as faixas etárias. Relatos recentes têm demonstrado a associação crescente destes vírus a surtos de DD (Scallan *et al.*, 2011; Chitambar *et al.* 2012; Enserink *et al.*, 2015; Luchs *et al.*, 2016), mostrando assim a importância da investigação e vigilância constante destes vírus em casos de surto, principalmente no Brasil, onde a vacina contra RVA (Rotarix®, GlaxoSmithKline, Rixensart, Bélgica) faz parte do calendário de vacinação pelo PNI, desde 2006.

Os RVA, HAdV, NoV e HAstV têm sido detectados na DD em pacientes com HIV-1/AIDS (Gonçalves *et al.*, 2009, Rossit *et al.* 2009, Silva *et al.*, 2010, Morillo *et al.*, 2010). No entanto, apesar de se conhecer a importância destes vírus como causadores de DD na população em geral, entre os pacientes com HIV-1/AIDS, a investigação contínua destes vírus é necessária, principalmente porque os indivíduos imunocomprometidos apresentam maior suscetibilidade às infecções e reinfecções por agentes virais (Al Anazi, 2009; Vizzi & Ângulo Medina, 2013). Embora a utilização da HAART tenha reduzido a incidência das infecções gastrointestinais, a diarreia ainda afeta aproximadamente 90% dos pacientes com HIV/AIDS (Dwivedi *et al.*, 2007), que com as infecções oportunistas e associadas à desnutrição, podem resultar no óbito.

Os vírus emergentes, HBoV e AiV-1, também foram demonstrados nas DD (Chow & Esper 2009, Khamrin *et al.*, 2011, Reuter *et al.*, 2011). Porém, ainda há necessidade de investigação do papel destes em pacientes HIV-1/AIDS.

No Brasil, apesar da existência de estudos que avaliem a presença de alguns destes vírus em adultos e crianças HIV-1 soropositivos desde a década de 90, estes ainda são escassos (Machado *et al.*, 1996, Gabbay *et al.*, 2001, Rossit *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2009, Morillo *et al.*, 2010, Silva *et al.*, 2010). Além disso, estudos que

investiguem a presença de HAdV entéricos, HBoV e AiV-1 entre as crianças com HIV-1/AIDS ainda são inexistentes.

Assim, devido à falta de dados mais consistentes sobre o papel destes vírus como agentes etiológicos da DD entre os pacientes com HIV-1/AIDS, ao pequeno número de estudos realizados, à carência de informações epidemiológicas sobre a circulação destes agentes e a diversidade genética destes vírus, torna-se evidente a necessidade de um estudo visando conhecê-los mais detalhadamente. Neste contexto, este estudo pretende investigar e avaliar o papel destes vírus em um centro de referência para tratamento de crianças com HIV-1/AIDS, retrospectivamente, no período de 1997 a 2010 e de um surto ocorrido em 2013, no Rio de Janeiro.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Investigar e caracterizar os diferentes vírus gastroentéricos já estabelecidos (RVA, NoV, HAdV e HAstV) ou emergentes (HBoV e AiV) em crianças com doença diarreica, infectadas ou não infectadas pelo HIV-1 no estado do Rio de Janeiro.

#### **3.1 ESPECÍFICOS**

1. Investigar a presença de AiV-1 e realizar a genotipagem dos vírus identificados; (artigo 1)
2. Investigar a taxa de detecção de RVA, NoV, HAstV, HAdV e HBoV e caracterizar os genótipos virais; (artigo 2)
3. Investigar a frequência de codetecções dos vírus gastroentéricos na população de estudo; (artigo 2)
4. Determinar a carga viral dos vírus gastroentéricos detectados; (artigo 2)
5. Avaliar a infecção recorrente, caracterizar o genótipo e a carga viral do HAdV em crianças HIV-1 soropositivas hospitalizadas e com DD entre 1997 e 2010; (artigo 3)
6. Investigar a etiologia viral desconhecida de um surto de DD na cidade do Rio de Janeiro em 2013 e realizar a genotipagem do vírus identificado (artigo 4);

## **4 METODOLOGIA E RESULTADOS**

A metodologia e resultados deste trabalho de tese serão apresentados sob a forma de manuscritos publicados ou submetidos à publicação em revistas indexadas. Os manuscritos estão listados a seguir na ordem em que as publicações foram discutidas.

**4.1 Artigo 1- Aichi Virus Positivity in HIV-1 Seropositive Children Hospitalized with Diarrheal Disease (Publicado na *Current HIV Research* 2015; 13 (4):325-31)**

**4.2 Artigo 2- Enteric Viruses in HIV-1 Seropositive and HIV-1 Seronegative Children with Diarrheal Diseases in Brazil (Publicado na *PLOS ONE* 2017;12(8):e0183196.)**

**4.3 Artigo 3- Recurrent infections with human adenoviruses in HIV-1 seropositive children with diarrheal disease in Brazil (Artigo submetido no *Jornal de Pediatria*)**

**4.4 Artigo 4- A non-enteric adenovirus A12 gastroenteritis outbreak in Rio de Janeiro, Brazil (Publicado nas *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2016;111(6):403-6. doi: 10.1590/0074-02760160030.**

#### **4.1 Artigo 1- Aichi Virus Positivity in HIV-1 Seropositive Children Hospitalized with Diarrheal Disease**

Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao objetivo específico:

1. Investigar a presença de AiV-1 e realizar a genotipagem dos vírus identificados.

Situação do manuscrito: Artigo publicado na revista científica- Current HIV Research

Referência: Portes SA, de Mello Volotao E, Rose TL, Rocha MS, Trindade Pinheiro Xavier Mda P, de Assis RM, Fialho AM, Rocha MS, Miagostovich MP, Gagliardi Leite JP, Carvalho-Costa FA. Aichi Virus Positivity in HIV-1 Seropositive Children Hospitalized with Diarrheal Disease. Curr HIV Res. 2015;13(4):325-31.

## Aichi Virus Positivity in HIV-1 Seropositive Children Hospitalized with Diarrheal Disease

Silvana Augusta Rodrigues Portes<sup>\*1</sup>, Eduardo de Mello Volotão<sup>1</sup>, Tatiana Lundgren Rose<sup>1</sup>, Monica Simões Rocha<sup>1</sup>, Maria da Penha Trindade Pinheiro Xavier<sup>1</sup>, Rosane Maria de Assis<sup>1</sup>, Alexandre Madi Fialho<sup>1</sup>, Myrna Santos Rocha<sup>2</sup>, Marize Pereira Miagostovich<sup>1</sup>, José Paulo Gagliardi Leite<sup>1</sup> and Filipe Anibal Carvalho-Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>2</sup>Hospital Municipal Jesus, Rio de Janeiro, Brazil



S.A.R. Portes

**Abstract:** Aichi viruses (AiV) have been detected in patients with diarrheal diseases (DD). The aim of this study was to assess AiV infection rates in hospitalized children with DD, including 123 HIV-1 seropositive and 125 HIV-1 seronegative patients, in two public pediatric hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. AiV was investigated by nested RT-PCR. The AiV-positive samples were also tested for specie A rotavirus, norovirus, astrovirus, enteric adenovirus and bocavirus in order to assess co-infections. AiV parical genome sequencing and phylogenetic analyses were performed. AiV were detected in 9/123 (7.32%) of the HIV-1 seropositive subjects and 1/125 (0.8%) of the HIV seronegative patients with DD ( $p = 0.019$ ). The phylogenetic analysis of positive samples disclosed that: i) 13 samples were characterized as genotype A, with one of them being from the HIV-1 seronegative patient; ii) one sample from a HIV-1 seropositive patient was characterized as genotype B. AiV genotype A was grouped into 3 genetic clusters. Data suggest that AiV may be an opportunistic pathogen infecting children with AIDS and DD.

**Keywords:** Aichi virus, AIDS, children, diarrheal disease, HIV-1, oportunistic agent.

### INTRODUCTION

Viruses are common etiological agents of diarrheal diseases (DD) worldwide. Among the viruses that usually cause diarrhea are group A rotaviruses (RVA), noroviruses (NoV), astrovirus (HAstV) and enteric adenovirus (EAdV). Aichi virus (AiV) was recently described as a single-stranded RNA agent classified in the family *Picornaviridae*, genus *Kobuvirus* which is composed of four species, but only AiV were described infecting humans [1]. The identification of AiV from sporadic cases and DD outbreaks, with detection rates ranging from 0.5 to 2% in Europe and Asia [2-7], and over 3% in Tunisia [8], led to the proposal that AiV should be an etiological agent of DD [1].

Acute, persistent and chronic DD are particularly important among human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) seropositive patients [9,10], contributing to morbi-mortality in this group. Among the clinical manifestations of HIV-1/Aquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), gastrointestinal disorders are formidable and worrisome, since this group is susceptible to classic pathogens and opportunistic agents [11]. The severity of DD episodes ranges from mild to severe cases leading to hospitalization or death. Morbimortality among HIV-1 seropositive patients

has altered importantly since the wide spread use of highly active antiretroviral therapy (HAART) [12].

Many viruses have been reported in opportunistic DD in HIV-1/AIDS seropositive patients [12-15]. In Brazil, cytomegalovirus (CVM), adenoviruses (AdV), bocaviruses (HBoV) and herpes simplex virus 1 and 2 (HSV-1/2) have been identified in adult patients with AIDS, frequently associated to parasitic organisms such as *Isoospora belli*, *Giardia duodenalis*, *Strongyloides stercoralis* and *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* [16]. In Tanzania it was observed that the prevalence of RVA infection is lower in HIV positive than in HIV negative children with DD [17]. Contrarily, it has been proposed that HIV positive children with DD are more frequently infected with caliciviruses than those HIV negative [18]. Recently, Epstein-Barr virus (EBV) associated colitis was described in a HIV infected patient [19]. The detection rate of at least one enteric virus in HIV positive patients with DD ranged from 6.4% to 52% in different studies conducted in South America and the United States [20-23]. Nevertheless, despite the diagnostic assays which are now available, etiological agents of many DD cases in HIV-1 seropositive patients often remain unrecognized. Newly recognized enteric viruses (including AiV) have been identified in stool samples from HIV-positive patients with DD through high-throughput genomic sequencing approach [24]. Nevertheless, the role of these pathogens as etiological agents of DD in immunocompromised patients has not yet been established. In this context, there is a lack of information concerning the prevalence and significance of AiV infection in HIV-1 seropositive patients.

\*Address correspondence to this author at the Oswaldo Cruz Foundation, Oswaldo Cruz Institute, Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Pav. Helio & Peggy Pereira, Av. Brazil 4.365 - Mangunhos - 21040-360 - Rio de Janeiro - RJ - Brazil;  
Tel: +55 21 25621899; Fax: +55 21 25621851; E-mail: sil@ioc.fiocruz.br

In Brazil, AIDS incidence in children and adolescents  $\leq$  15 years old has decreased from 1,424 new cases in 2003 to 354 in 2011, following intensification of HIV-1 testing during pregnancy, implementation of rapid anti-HIV-1 testing in maternities and the universal access to antiretroviral prophylaxis implemented by the Brazilian government in the last two decades. Even with this important progress, AIDS is an important public health concern in Brazil. The current annual incidence rate has reached 17.6/100,000 and there are 608,230 people living with HIV-1/AIDS in the country [25].

In Brazil, as well as in Americas, there are no reports describing the detection rate of AiV in HIV-1 seropositive patients. The aim of this study was to investigate the presence of AiV in hospitalized children with DD, including HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative patients, in two public pediatric hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. In addition, genotypes of AiV were characterized in the positive samples.

## PATIENTS AND METHODS

### Setting

The study was conducted in the city of Rio de Janeiro, Southeastern coastal Brazil. The city is home of 6,300,000 inhabitants; the incidence rate of AIDS is 41.1 new cases/100,000 inhabitants/year, one of the highest in the country. Rio de Janeiro has a network of public hospitals belonging to the Unified Health System (SUS, portuguese acronym for Sistema Único de Saúde). Among these hospitals, Jesus Municipal Hospital (JMH) is a tertiary pediatric center, providing specialized medical care for children with AIDS and other conditions. Salles Netto Municipal Hospital (SNMH) is a pediatric hospital providing health care especially for DD and acute respiratory infections. Both hospitals are located in the central zone of Rio de Janeiro, 6 km distant from each other, and capable of providing treatment for children from low and middle socioeconomic status, many of whom live in downtown slums. Laboratory analyses were performed at the Laboratory of Comparative and Environmental Virology (LVCA) of Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), at a distance of 10 km from both hospitals.

### Study Design and Collection of Fecal Samples

Considering the clinical particularity of each hospital, 123 HIV-1 seropositive and 125 HIV-1 seronegative patients hospitalized with DD were recruited in JMH and SNMH, respectively. HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children were matched by year and age. HIV-1 seropositive children were aged 4 to 156 months-old, with 45.5% being female. HIV-1 seronegative children were aged 4 to 132 months-old, with 44.8% being female (Table 1). A case of DD was defined by the presence of liquid or semi-liquid stools (with or without vomiting, fever, and abdominal pain) associated with dehydration severe enough to indicate hospitalization and parenteral fluid replacement. Patients included were participants in a project of DD monitoring conducted in Rio de Janeiro during the study period. All patients included had acute diarrhea on admission; 45 HIV-1

positive children (37%) developed persistent diarrhea (characterized by more than 15 days evacuating liquid or semi-liquid feces) during hospitalization. Those with persistent diarrhea had fecal samples examined more than once for the purpose of better characterizing AiV positivity and detecting prolonged excretion of enteric viruses. For both HIV-1 positive and HIV-1 negative subjects, inclusion criteria was the presence of acute DD at admission, with necessity of hospitalization for parenteral fluid replacement. Diarrheal fecal samples obtained by spontaneous evacuation were collected in plastic bottles by health personnel during hospitalization, and stored briefly in the hospital at 4 °C until transport to the LVCA, where they were transferred to freezers at -20 °C until the preparation of fecal suspensions for laboratory analyses. Among 123 HIV-1 seropositive children, 254 fecal samples were collected. One to 10 faecal samples from each HIV-1 positive child were analyzed at distinct time points. Concerning HIV-1 seronegative, one fecal sample from each child was studied, since they were obtained from patients with non-complicated DD which resolved in less than 15 days. These HIV-1 negative children were discharged without complications.

The detection rate of AiV in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children was compared through the Fisher's Exact Test (two-tailed). Statistical significance was established at  $p < 0.05$ .

Sample collections and analysis were approved by the Ethical Research Committee of Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) (311/2006).

### Detection and Genotyping of Aichi Viruses

Nucleic acids were extracted from 10% (v/v) fecal suspensions in Tris-Ca<sup>2+</sup> buffer, pH 7.2, using QIAmp<sup>®</sup> viral RNA Mini kit (QIAGEN<sup>®</sup>, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Presence of AiV RNA in fecal samples was determined by using nested RT-PCR targeting the 3CD junction region as described previously [1,26]. Genotyping of AiV was performed by direct sequencing of the products obtained from the first amplification [1]. The amplicons were purified using the QIAamp<sup>®</sup> PCR Purification Kit (QIAGEN, CA, USA) following manufacture's recommendations. PCR products were sequenced in both directions using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer and Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystem, CA, USA). Centri-Sep columns (Princeton Separations, CA, USA) were used for purification of sequencing reaction products according to the manufacturer's instructions. Nucleotide identity of the sequenced amplicons was determined using BLAST analysis followed by sequence alignment with reference strains available in GenBank database using CLUSTAL W program. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining algorithm and Kimura 2-parameter distance model and tested by applying the bootstrap test with 1,000 bootstrap replications using MEGA 5 software [27]. The nucleotide sequences reported in this study have been deposited in the GenBank under the access number JX573299 - JX573311 and KM099401.

The AiV-positive samples were also tested for specie A rotavirus (RVA), noroviruses (NoV), astroviruses (HAstV)

**Table 1.** Characteristics of children hospitalized with diarrheal diseases in public pediatric hospitals in Rio de Janeiro, Brazil, 1997-2010.

	HIV-1 Seropositive Children in Jesus Municipal Hospital (n=123)	HIV-1 Seronegative Children in Salles Netto Municipal Hospital (n=125)
<b>Children Age Group (Months)</b>		
1 - 12	24 (19.5%)	33 (26.4%)
13 - 24	26 (21.1%)	28 (22.4%)
25 - 48	31 (25.2%)	27 (21.6%)
49 - 120	32 (26.0%)	31 (24.8%)
120 - 180	10 (8.1%)	6 (4.8%)
<b>Gender (Proportion Female)</b>	45,5%	44,8%
<b>Year</b>		
1997	14 (11.4%)	15 (12.0%)
1998	7 (5.7%)	9 (7.2%)
1999	11 (8.9%)	10 (8.0%)
2000	17 (13.8%)	17 (13.6%)
2001	24 (19.5%)	25 (20.0%)
2002	8 (6.5%)	9 (7.2%)
2003	7 (5.7%)	8 (6.4%)
2004	6 (4.9%)	7 (5.6%)
2005	11 (8.9%)	12 (9.6%)
2006	6 (4.9%)	6 (4.8%)
2007	4 (3.2%)	4 (3.2%)
2008	3 (2.4%)	3 (2.4%)
2009	4 (3.3%)	0
2010	1 (0.8%)	0
<b>Total</b>	<b>123</b>	<b>125</b>

HIV-1= Human immunodeficiency virus type 1.

and enteric adenoviruses (EAdV) as described previously [28-30].

## RESULTS

Characteristics of the studied subjects, including HIV-1 viral load, CD4<sup>+</sup> lymphocyte account, and HAART therapy are presented in Table 2. AiV were detected in 9/123 (7.32%) and 1/125 (0.8%) of the HIV-1 seropositive and seronegative children, respectively ( $p = 0.019$ ; two-tailed Fisher's Exact Test). Table 3 shows the clinico-epidemiological characteristics of the nine AiV-positive children from which 13 positive samples were obtained. Three HIV-1 seropositive children presented single infection with AiV, wherein one child (patient 2), was severely immunocompromised (CD4<sup>+</sup> lymphocyte count = 13 cells/mm<sup>3</sup>; viral load log = 5.62). This child remained hospitalized and AiV was detected in two fecal samples, collected within an interval of 48 days. Another child (patient 4), also severely immunocompromised (CD4<sup>+</sup>

lymphocyte count = 13 cells/mm<sup>3</sup>, viral load log = 4.15) presented persistent AiV excretion, with positive fecal samples obtained upon admission (day zero) and 41, 86, and 116 after hospitalization. This child presented the following mixed infections: AiV/NoV/HAdV (day zero); AiV/NoV (day 41); AiV/NoV/HBoV (day 86); and AiV/NoV/HBoV/EAdV (day 116) (Table 3). One case of mixed infection AiV/RVA was observed in a previously healthy HIV-1 seronegative patient aged 10 months-old at SNMH.

The phylogenetic analysis of 14 AiV positive samples disclosed that: i) 13 samples were characterized as genotype A, with one of them being from the HIV-seronegative patient; ii) one sample from a HIV-seropositive patient was characterized as genotype B. The AiV genotype A was grouped into 3 clusters (Fig. 1). The AiV from patient 2 (days zero and 48<sup>th</sup>) presented 100% nucleotide similarity. The four AiV positive samples from patient 4 clustered into two different branches (days zero and 41<sup>th</sup>; days 86<sup>th</sup> and 116<sup>th</sup>), however they were closely related (Fig. 1).

**Table 2.** Characteristics of 123 HIV-1 seropositive patients in 213 hospital admissions for diarrheal disease, Rio de Janeiro, Brazil, 1997 – 2010.

Characteristic	n	%
<b>Gender</b>		
Male	95	44.6
Female	118	55.4
<b>Age group (months)</b>		
0 – 12	29	13.6
13 – 24	35	16.4
25 – 48	54	25.4
49 – 60	10	4.7
61 – 120	56	26.3
> 120	23	10.8
Unknown	6	2.8
<b>CD4<sup>+</sup> lymphocyte count (cells/mm<sup>3</sup> blood)</b>		
< 100	94	44.1
100 – 200	25	11.7
201 – 350	15	7
351 – 600	11	5.2
> 600	-	-
Unknown	68	31.9
<b>Antiretroviral therapy</b>		
3TC + RTV/SAQ + NEV; AZT + DDI + RTV/SAQ; AZT + 3TC + SAQ; AZT + DDI + SAQ; 3TC + NFV + NEV; 3TC + D4T + AMP; D4T + RTV/SAQ + ABC; D4T + EFV + tenofovir; D4T + NFV + NEV; 3TC + EFV; D4T + NEV; 3TC + RTV/SAQ + D4T; 3TC + RTV/SAQ; AZT + 3TC + RTV/SAQ + TDF; AZT + 3TC + RTV/SAQ + EFV; AZT + 3TC + NFV + NEV; AZT + 3TC + RTV/SAQ + NFV; AZT + 3TC + NFV + SAQ; AZT + NFV + DDI + D4T; 3TC + RTV/SAQ + TDF + EFV	1	0.5
AZT + 3TC + ABC + AMP; D4T + AMP + EFV; 3TC + NFV + NEV + D4T	2	0.9
AZT + 3TC + DDI; AZT + 3TC + EFV; 3TC + DDI + RTV/SAQ; AZT + DDI + NEV; AZT	3	1.4
3TC + D4T + SAQ	4	1.9
3TC + NFV + D4T; DDI + D4T + NFV	7	3.3
AZT + 3TC + ABC	8	3.7
AZT + 3TC + RTV/SAQ; AZT + NFV + DDI; AZT + 3TC + NFV	9	4.2
AZT + 3TC	28	13.1
AZT + DDI	42	19.7
3TC + D4T	17	15
No antiretroviral therapy	32	15
<b>HIV-1 viral load (log)</b>		
1.7 – 2.7	1	0.5
2.7 – 3.7	5	2.3
3.7 – 4.7	35	16.4
4.7 – 5.7	56	26.3
5.7 – 6.7	13	6.1
> 6.7	1	0.5
Unknown	102	47.9

3TC = Lamivudine, D4T = Stavudine, RTV/SAQ = Ritonavir/Saquinavir, AZT = Zidovudine, LPV = Lopinavir, NFV = Nelfinavir, ABC = Abacavir, DDI = Didanosine, TDF = Tenofovir, EFV = Efavirenz, NEV = Nevirapine. HIV-1 = Human immunodeficiency virus type 1.

**Table 3.** Clinical and epidemiological characteristics of nine Aichi virus positive children with AIDS, hospitalized with diarrhea disease, in Rio de Janeiro, Brazil, 1997 – 2010.

Patient ID	Age (Months)	Gender	CD4 <sup>+</sup> Count <sup>a</sup>	HIV-1 Viral Load <sup>b</sup>	Antiretroviral Therapy <sup>c</sup>	Aichi Positive Samples	Genotype	Aichi Virus Single or Mixed Infections
1	84	Male	290	5.11	3TC + D4T + NFV	1	A	AiV/HBoV/EAdV
2	38	Male	13	5.62	3TC+ D4T + RTV	2	A	AiV
3	36	Male	158	5.11	3TC+ D4T + NFV	1	A	AiV/NoV/EAdV
4	72	Female	13	4.15	3TC+D4T+RTV/SAQ	4	A	AiV/NoV/HBoV/HAsV/ EAdV
5	72	Male	188	5.3	3TC+ D4T+ RTV	1	A	AiV/NoV/HBoV/EAdV
6	91	Female	130	NA	3TC + AZT + ABC	1	A	AiV/NoV
7	106	Male	158	NA	3TC + RTV/SAQ	1	A	AiV/NoV
8	60	Male	148	NA	3TC + AZT + LPV	1	A	AiV
9	40	Female	101	4.85	3TC + AZT + RTV	1	B	AiV

<sup>a</sup>CD4<sup>+</sup> lymphocyte count (cells/mm<sup>3</sup>);

<sup>b</sup>Viral load (Log of viral copies/mm<sup>3</sup>), NA= not assessed;

<sup>c</sup>3TC = Lamivudine, D4T = Stavudine, RTV/SAQ = Ritonavir/Saquinavir, AZT = Zidovudine, LPV = Lopinavir, NFV = Nelfinavir, ABC = Abacavir; NoV = Norovirus, HBoV = Human Bocavirus, HAsV = Human Astrovirus, EAdV=Enteric adenovirus, HIV-1= Human immunodeficiency virus type 1, AIDS=Acquired immunodeficiency syndrome.

## DISCUSSION

To date, no studies aimed to estimate the prevalence of AiV infection in HIV-1-seropositive children with DD. In this context, the role of AiV as an etiological agent of DD in children with HIV infection has been unclear. The present study identified higher AiV positivity rate among HIV-1 seropositive than in HIV-1 seronegative children. A study involving HIV-1 seropositive adults also showed a high rate of AiV detection among individuals with DD [24]. Concerning HIV-1 negative children, the low AiV positivity presented in this survey is similar to results previously reported in immunocompetent individuals (ranging from 0.5% to 2%, except for those described in Tunisia, which reached 4.1%) [2-5,8].

Among the studied children with AIDS, some presented persistent DD, consequently rendering more than one sample for AiV analyses. This complication was not observed among HIV-1 negative children. The analyses of fecal samples collected from children with persistent DD allowed detection of prolonged shedding of AiV in two HIV-1 positive children. Importantly, HIV-1 seropositive patients infected by AiV were severely immunocompromised even being under HAART. Although we can not affirm that AiV was effectively the etiological agent of studied DD cases in which it was identified, it can be considered that AiV most often infects immunosuppressed children with AIDS when compared with children without HIV-1 infection, taking into account that the clinical status of HIV-1 positive children was more severe when compared to HIV-1 negative.

Given the fact that AiV as a main cause of DD is still controversial, it became necessary to determine the presence of co-infections with other viral pathogens. It was observed that, among AiV-positive children with DD and AIDS, nine samples were coinfecting with other gastroenteric viruses such as RVA, NoV, HAsV and HAdV. The AiV-positive sample detected from a HIV-1 seronegative patient was

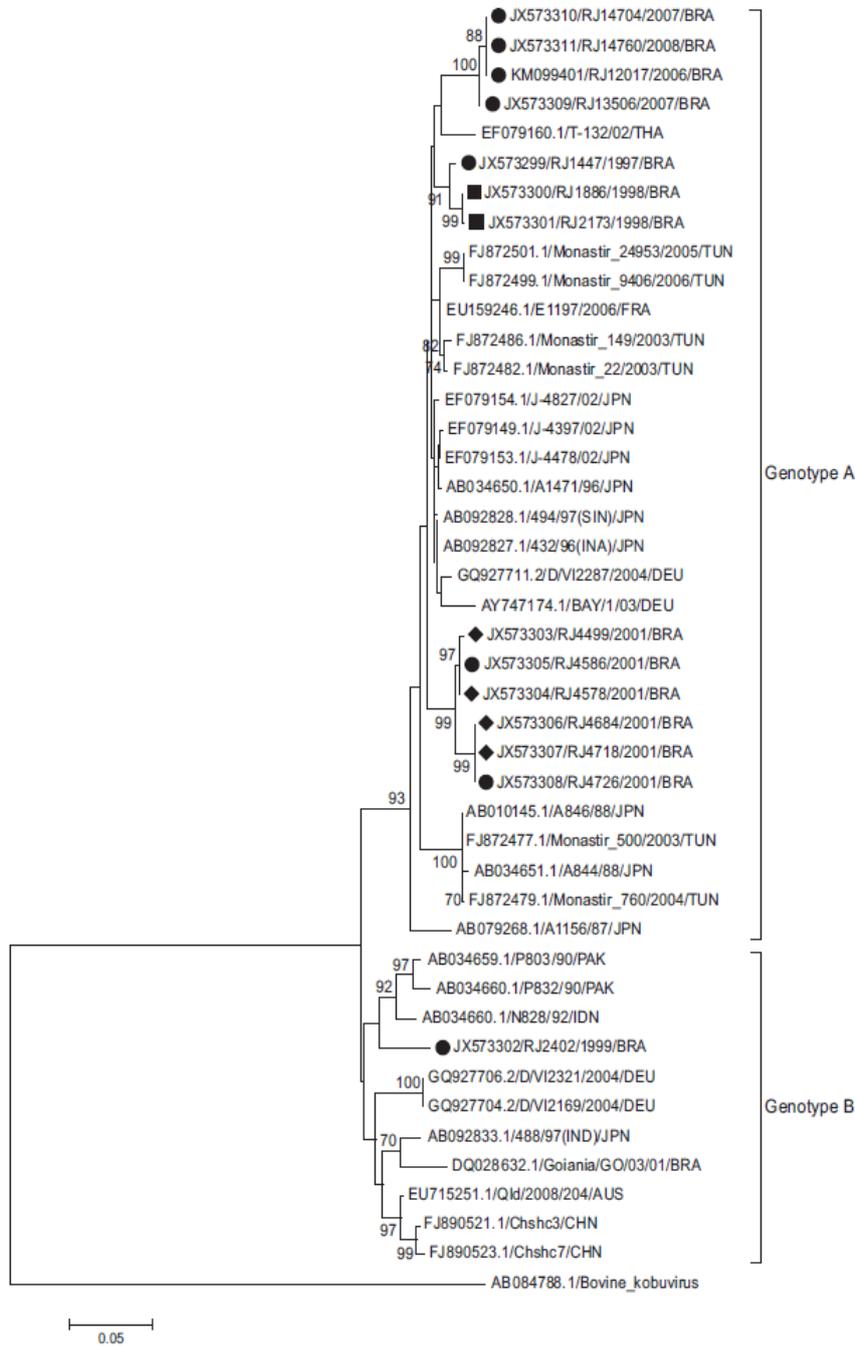
mixed with RVA. Results of this study support the current observations that AiV is found frequently in mixed infections [4,7]. AiV was the single viral agent in only three children.

This study showed the circulation of AiV genotype A and confirmed the presence of genotype B in Brazil. So far, genotype A has not yet been identified in Americas and genotype B has been detected only in Brazil [31] and Venezuela [32]. AiVs genotype A shared 94.3-100% similarity with each other and 95.4 to 98% sequence identities with circulating strains from Japan [1,26] and Germany [3]. The genotype B sequence showed 91.5-95.1% nucleotide similarity with genotype B strains available in the GenBank data base. AiV genotype B was more related to strains from Pakistan (95,1%) and Indonesia (94,3%) than with Brazil (91.5%) [1,31]. Our data show that the majority of AiV strains identified in HIV-1 seropositive children in Rio de Janeiro were characterized as genotype A. This is the first report of AiV genotype A in the Americas, and this genotype had been previously observed in immunocompetent patients in Europe [2,3], Asia [4,5], and Africa [8]. Considering HIV-1 seropositive patients, only one study showed the detection of AiV in adults, but the characterization of the genotypes has not been shown in this population [24].

This study adds knowledge about AiV infection in children, suggesting that, among hospitalized children with DD, AiV is detected more frequently in immunosuppressed children with HIV/AIDS than among immunocompetent subjects. Additional studies are needed in order to establish AiV as an etiological agent of DD in children with HIV/AIDS.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.



**Fig. (1).** Phylogenetic analysis of Aichi virus based on the partial nucleotide sequence (468bp) of the 3CD junction region of non-structural gene. Neighbor-joining dendrograms were constructed with the MEGA 5 program. The studied samples are marked (circle), squares and diamonds represent samples from patients 2 and 4, respectively. The GenBank access numbers and countries of origin are shown. The abbreviations for countries are as follows: BRA (Brazil), CHN (China), DEU (Germany), IND (India), IDN (Indonesia), JPN (Japan), PAK (Pakistan), THA (Thailand) and TUN (Tunisia). Bovine kobuvirus was used as an outgroup. Bootstrap values above 70%, estimated with 1,000 pseudoreplicate data sets, are indicated at each node.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Juliana da Silva Andrade for technical assistance. The authors thank the staff at Jesus Municipal Hospital, Salles Netto Municipal Hospital, and Genomic Platform of DNA sequencing PDTIS/Fiocruz. This study was sponsored by Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), PAPES/Fiocruz-CNPq, PROEP/Fiocruz-CNPq, Coordination for Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ).

## REFERENCES

- [1] Yamashita T, Sugiyama M, Tsuzuki H, *et al.* Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the Picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2955-61.
- [2] Kaikkonen S, Rasanen S, Ramet M, Vesikari T. Aichi virus infection in persons with acute gastroenteritis in Finland. *Epidemiol Infect* 2010; 138: 1166-71.
- [3] Drexler JF, Baumgarte S, de Souza Luna LK, *et al.* Aichi virus shedding in high concentrations in patients with acute diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1544-48.
- [4] Yang S, Zhang W, Shen Q, *et al.* Aichi virus strains in persons with gastroenteritis, China. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1703-05.
- [5] Verma H, Chitambar SD, Gopalkrishna V. Circulation of Aichi virus genotype B strains in persons with acute gastroenteritis in India. *Epidemiol Infect* 2011; 139: 1687-91.
- [6] Han TH, Park SH, Hwang ES, *et al.* Detection of Aichi virus in South Korea. *Arch Virol* 2014; 159 (7): 1835-39.
- [7] Jonsson N, Wahlström K, Svensson L, *et al.* Aichi virus infection in elderly people in Sweden. *Arch Virol* 2012;157(7):1365-69.
- [8] Sdiri-Loulizi K, Hassine M, Gharbi-Khelifi H, *et al.* Detection and genomic characterization of Aichi viruses in stool samples from persons in Monastir, Tunisia. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2275-78.
- [9] Arvelo W, Kim A, Creek T, *et al.* Case-control study to determine risk factors for diarrhea among persons during a large outbreak in a country with a high prevalence of HIV infection. *Int J Infect Dis* 2010; 14: e1002-07.
- [10] Groome MJ, Madhi SA. Five-year cohort study on the burden of hospitalisation for acute diarrhoeal disease in African HIV-infected and HIV-uninfected children: potential benefits of rotavirus vaccine. *Vaccine* 2012; 30 Suppl 1:A173-8.
- [11] Grohmann GS, Glass RI, Pereira HG, *et al.* Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 1993; 329(1): 14-20.
- [12] Pollok RCG. (2008) Viruses Causing Diarrhoea in AIDS, in *Gastroenteritis Viruses: Novartis Foundation Symposium 238* (eds D. Chadwick and J. A. Goode), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- [13] Thomas PD, Pollok RC, Gazzard BG. Enteric viral infections as a cause of diarrhoea in the acquired immunodeficiency syndrome. *HIV Med* 1999;1(1):19-24.
- [14] Rossit ARB, Gonçalves ACM, Franco C, Machado RLD. Etiological agents of diarrhea in patients infected by the human immunodeficiency virus-1: A review. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2009; 51(2):59-65.
- [15] Gonçalves ACM, Gabbay YB, Mascarenhas JD, *et al.* Calicivirus and Giardia lamblia are associated with diarrhea in human immunodeficiency virus-seropositive patients from southeast Brasil. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81: 463-66.
- [16] Silva RC, Benati FJ, Pena GP, Santos N. Molecular characterization of viruses associated with gastrointestinal infection in HIV-positive patients. *Braz J Infect Dis* 2010;14(6):549-52.
- [17] Moyo SJ, Blomberg B, Hanevik K, *et al.* Genetic diversity of circulating rotavirus strains in Tanzania prior to the introduction of vaccination. *PLoS One* 2014; 20;9(5):e97562.
- [18] Rodríguez-Guillén L, Vizzi E, Alcalá AC, *et al.* Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. *J Clin Virol* 2005;33(2):104-9.
- [19] Hamada Y, Nagata N, Honda H, *et al.* Epstein-Barr virus associated colitis in an HIV-infected patient. *AIDS* 2012; 26(3):400-2.
- [20] Giordano MO, Martinez LC, Rinaldi D *et al.* - Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. *AIDS Res. hum. Retroviruses* 1999; 15: 1427-1432.
- [21] González GG, Pujol FH, Liprand F, *et al.* Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. *J med Virol* 1998; 55: 288-292.
- [22] Grohmann GS, Glass RI, Pereira HG *et al.* - Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. *Enteric Opportunistic Infections Working Group. New Engl J Med* 1993; 329: 14-20.
- [23] Liste MB, Natera I, Suarez JA *et al.* Enteric virus infections and diarrhea in healthy and human immunodeficiency virus infected-children. *J clin Microbiol* 2000; 38: 2873-2877.
- [24] Oude Munnink BB, Canuti M, Deijns M, *et al.* Unexplained diarrhoea in HIV-1 infected individuals. *BMC Infect Dis.* 2014; 14:22.
- [25] Ministry of Health. *Epidemiological Bulletin: AIDS and STD, year VIII (1) January-June, Brasilia, Brazil.2011 Nov 28.* [in Portuguese]. [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2011/5/0652/boletim\\_aids\\_2011\\_final\\_m.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2011/5/0652/boletim_aids_2011_final_m.pdf) 26659.pdf 01/17/2013.
- [26] Pham NT, Khamrin P, Nguyen TA, *et al.* Isolation and molecular characterization of Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2287-88.
- [27] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 2011; 28: 2731-39.
- [28] Ferreira MS, Xavier M da P, Tinga AC, *et al.* Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). *PLoS One* 2012; 7: e33754.
- [29] Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, *et al.* Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis* 2010; 201(11):1633-1643.
- [30] Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 498-505.
- [31] Oh DY, Silva PA, Hauwoeder B, *et al.* Molecular characterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America. *Arch Virol* 2006; 151: 1199-1206.
- [32] Alcalá A, Vizzi E, Rodríguez-Díaz J, *et al.* Molecular Detection and Characterization of Aichi Viruses in Sewage-Polluted Waters of Venezuela. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(12):4113-5.

## **4.2 Artigo 2- Enteric Viruses in HIV-1 Seropositive and HIV-1 Seronegative Children with Diarrheal Diseases in Brazil.**

Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes aos objetivos específicos:

2. Investigar a taxa de detecção de RVA, NoV, HAstV, HAdV e HBoV e caracterizar os genótipos virais;
3. Investigar a frequência de co-deteções dos vírus gastroentéricos na população de estudo;
4. Determinar a carga viral dos vírus gastroentéricos detectados

Situação do manuscrito: Artigo publicado na revista científica- *PLOS ONE*

Referência: Silvana Augusta Rodrigues Portes, Filipe Anibal Carvalho-Costa, Monica Simões Rocha, Tulio Machado Fumian, Adriana Gonçalves Maranhão, Rosane Maria de Assis, Maria da Penha Trindade Pinheiro Xavier, Myrna Santos Rocha, Marize Pereira Miagostovich, José Paulo Gagliardi Leite, Eduardo de Mello Volotão.

RESEARCH ARTICLE

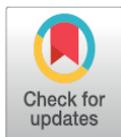
# Enteric viruses in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children with diarrheal diseases in Brazil

Silvana Augusta Rodrigues Portes<sup>1</sup>\*, Filipe Anibal Carvalho-Costa<sup>1,2</sup>\*, Monica Simões Rocha<sup>1</sup>, Tulio Machado Fumian<sup>1</sup>, Adriana Gonçalves Maranhão<sup>1</sup>, Rosane Maria de Assis<sup>1</sup>, Maria da Penha Trindade Pinheiro Xavier<sup>1</sup>, Myrna Santos Rocha<sup>3</sup>, Marize Pereira Miagostovich<sup>1</sup>, José Paulo Gagliardi Leite<sup>1</sup>, Eduardo de Mello Volotão<sup>1</sup>

**1** Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Escritório Regional Fiocruz Piauí, Teresina, Piauí, Brazil, **3** Hospital Municipal Jesus, Rio de Janeiro, Brazil

\* These authors contributed equally to this work.

\* [sil@ioc.fiocruz.br](mailto:sil@ioc.fiocruz.br)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Portes SAR, Carvalho-Costa FA, Rocha MS, Fumian TM, Maranhão AG, de Assis RM, et al. (2017) Enteric viruses in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children with diarrheal diseases in Brazil. *PLoS ONE* 12(8): e0183196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183196>

**Editor:** Oliver Schildgen, Kliniken der Stadt Köln gGmbH, GERMANY

**Received:** May 30, 2017

**Accepted:** July 31, 2017

**Published:** August 30, 2017

**Copyright:** © 2017 Portes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All sequence files are available from the GenBank database (accession numbers KY611586-KY611611; MF150192-MF150203; KY882298 - KY882312; KY910901-KY910941; KY753477-753502; MF034109-MF034119; MF034120-MF034125; MF156863-MF156875; MF156863-MF156866; MF156867-MF156875).

**Funding:** This study was sponsored by Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, National Council for Scientific and Technological Development (PAPES)

## Abstract

Diarrheal diseases (DD) have distinct etiological profiles in immune-deficient and immune-competent patients. This study compares detection rates, genotype distribution and viral loads of different enteric viral agents in HIV-1 seropositive (n = 200) and HIV-1 seronegative (n = 125) children hospitalized with DD in Rio de Janeiro, Brazil. Except for group A rotavirus (RVA), which were detected through enzyme immunoassay, the other enteric viruses (norovirus [NoV], astrovirus [HAstV], adenovirus [HAdV] and bocavirus [HBoV]) were detected through PCR or RT-PCR. A quantitative PCR was performed for RVA, NoV, HAstV, HAdV and HBoV. Infections with NoV (19% vs. 9.6%; p<0.001), HBoV (14% vs. 7.2%; p = 0.042) and HAdV (30.5% vs. 14.4%; p<0.001) were significantly more frequent among HIV-1 seropositive children. RVA was significantly less frequent among HIV-1 seropositive patients (6.5% vs. 20%; p<0.001). Similarly, frequency of infection with HAstV was lower among HIV-1 seropositive children (5.5% vs. 12.8%; p = 0.018). Among HIV-1 seropositive children 33 (16.5%) had co-infections, including three enteric viruses, such as NoV, HBoV and HAdV (n = 2) and NoV, HAstV and HAdV (n = 2). The frequency of infection with more than one virus was 17 (13.6%) in the HIV-1 negative group, triple infection (NoV + HAstV + HBoV) being observed in only one patient. The median viral load of HAstV in feces was significantly higher among HIV-1 positive children compared to HIV-1 negative children. Concerning children infected with RVA, NoV, HBoV and HAdV, no statistically significant differences were observed in the medians of viral loads in feces, comparing HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children. Similar detection rates were observed for RVA, HAstV and HAdV, whilst NoV and HBoV were significantly more prevalent among children with CD4<sup>+</sup> T lymphocyte count below 200 cells/mm<sup>3</sup>. Enteric viruses should be considered an important cause of DD in HIV-1 seropositive children, along with pathogens more classically associated with intestinal infections in immunocompromised hosts.

VI/Fiocruz-CNPq-407566), PAEF/Fiocruz (10C008-FIO-15-71), Coordination for Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ- E-26/202.968/2015). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Diarrheal diseases (DD) represent one of the leading causes of mortality in children, accounting for almost 10% of deaths in this age group [1]. Viruses are among the most frequently enteric pathogens identified in children with DD worldwide [2]. Classic viral enteropathogens include group A rotaviruses (RVA), noroviruses (NoV), astrovirus (HAstV) and enteric adenovirus (HAdV-F). More recently, emerging agents such as bocavirus (HBoV) and Aichi virus (AiV) have been considered as potential etiological agents of DD [3–5].

RVA (Reoviridae family) are the major etiological agents associated with severe DD in children younger than 5 years of age in developed and developing countries [6]. RVA have been classified into 27 G genotypes and 37 P genotypes based on the nucleotide sequences of the VP7 (G-type) and VP4 (P-type) encoded genes. Combinations of G1, G2, G3, G4, G9, and G12 with P[4], P[6] and P[8] have been the most frequently detected in humans [7].

NoV (Caliciviridae family) are responsible for outbreaks and sporadic cases of DD in all age groups, accounting for 50% of all cases and more than 90% nonbacterial DD outbreaks [8]. NoV were classified into seven genogroups (GI to GVII) [9,10]. NoV GI, GII and GIV infect humans, with at least 36 genotypes described so far [8, 11, 12]. The NoV GII is the most frequently detected worldwide, with GII.4 being the most prevalent in DD [10].

HAstV are considered important etiological agents associated with DD in children under 5 years [13]. They belong to family Astroviridae and genus *Mamastrovirus* (MAstV 1- classical human astrovirus 1–8) and are often detected in children with DD, with HAstV-1 being most commonly detected [14].

HAdV are frequently detected in outbreaks and sporadic DD in children under 5 years [15, 16]. HAdV belong to Adenoviridae family, *Mastadenovirus* genus and are classified into seven species of HAdV (HAdV-A to -G) with a total of 78 types of HAdV reported. HAdV are associated with different syndromes such as respiratory infections, conjunctivitis and DD. Enteric HAdV-F40 and F41 (species F) are the third most common cause of non-bacterial diarrhea among children. Other species such as A, B, C, G and D have also been detected in DD [17].

Among emerging viral enteric pathogens, HBoV (*Parvoviridae* family) is a small non-enveloped single-stranded DNA virus identified in 2005 and proposed initially as a putative agent of acute respiratory tract infections [18]. HBoV has also been identified in human stool samples [19] and, in patients with DD, usually present in co-infections with other viral pathogens such as RVA, NoV, and HAstV [20, 21]. Four genotypes have been described: HBoV1 in respiratory samples and HBoV2, HBoV3 and HBoV4 in fecal samples [4, 19, 22].

DD is a very frequent clinical complication and a common cause of hospitalization and death among human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) seropositive children [23, 24, 25]. Concerning enteric viruses, different agents have been identified in association with DD in HIV-1 seropositive patients [26, 27, 28, 29]. The positivity for at least one viral agent in HIV-1 seropositive subjects with DD ranges between 6.4% and 52% in distinct surveys carried out in the United States and South America [23, 30, 31, 32].

DD has distinct etiological profiles in immune-deficient and immune-competent patients. In this context it was observed that the detection rate of RVA in children with DD is higher in HIV negative than in HIV positive children in Tanzania [33]. This contrasts with a higher positivity for caliciviruses among HIV-1 positive children when compared to HIV-1 negative children, as described in Venezuela [34].

In HIV-1 positive adults with DD in Brazil, agents such as herpes simplex virus 1 and 2 (HSV-1/2), cytomegalovirus (CVM), HAdV and emerging viruses such as HBoV have been identified; these viruses frequently co-infect patients harboring parasites, including *Isospora*

*belli*, *Giardia duodenalis*, *Strongyloides stercoralis* and *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* [35].

The objective of this study was to compare detection rates, genotype distribution and viral load of different enteric viral agents in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children hospitalized with DD in Rio de Janeiro, Brazil.

## Materials and methods

### Ethical statement

This study was approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (CEP No. 311/06) and is part of an official surveillance of the Brazilian Ministry of Health (MS, Portuguese acronym for Ministério da Saúde) of enteric pathogens to investigate the viral etiology of DD. This surveillance is performed through a hierarchical network in which the samples are provided by medical request in hospitals and health centers, monitored by Unified Health System (SUS, Portuguese acronym for Sistema Único de Saúde). Fecal samples were sent to the Laboratory of Comparative and Environmental Virology (LVCA) of the Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz/MS). Records containing epidemiological and clinical data followed each fecal sample. Data are maintained anonymously and securely.

### Setting

The study was performed in Rio de Janeiro, Brazil (population = 6,300,000 inhabitants). The incidence rate of HIV-1 infection is 41.1 new cases/100,000 inhabitants/year; one of the highest in the country. In Brazil, AIDS incidence in children has reduced substantially following implementation of HIV-1 testing during pregnancy, rapid anti-HIV-1 testing in maternity hospitals and the universal access of exposed newborns to antiretroviral prophylaxis. Children were recruited in two public pediatric hospitals: i) Hospital Municipal Jesus (HMJ), a tertiary pediatric center providing specialized medical care and ii) Hospital Municipal Salles Netto (HMSN), a pediatric general hospital. These hospitals are situated downtown in Rio de Janeiro, 6km distant from each other, providing medical care for children from low and middle socioeconomic status. Identification of enteric viruses was carried out at the LVCA (Fiocruz), 10km from both hospitals.

### Study design, case definition and collection of fecal samples

We compared 200 fecal samples representing different hospitalizations of 123 HIV-1 seropositive children in HMJ (so that some children [ $n = 49$ ] were hospitalized more than once) with 125 fecal samples representing hospitalizations of 125 seronegative children (in this group each children was hospitalized once) between the years 1997 and 2010. HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children were paired by year. The minimum period between hospitalizations was 2 months. Among the 123 HIV seropositive children, 98 (80%) were under highly active antiretroviral therapy (HAART). Among HIV-1 seropositive children, anti-HIV serological status was confirmed through ELISA and/or Western-blot assays. HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children were matched by age. Age group distribution among HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children was as follows: i) less than 25 months, 34% ( $n = 69$ ) and 49.5% ( $n = 62$ ); ii) 25 to 60 months, 28.6% ( $n = 57$ ) and 28% ( $n = 35$ ); more than 60 months, 37.4% ( $n = 74$ ) and 22.4% ( $n = 28$ ), respectively. HIV-1 seropositive children were immunocompromised to various degrees;  $CD4^+$  T lymphocyte count was assessed in 121 HIV-1 seropositive patients: 38 had  $\leq 100$  cells/mm<sup>3</sup>, 11 had 100–200 cells/mm<sup>3</sup>, 13 had 201–350 cell/mm<sup>3</sup>, 6 had 351–500 cells/mm<sup>3</sup> and 53 had  $> 500$  cells/mm<sup>3</sup>.

Children recruited were participants in a project of DD etiological monitoring conducted in both hospitals during the study period. DD was defined by liquid or semi-liquid stools (with or without fever, vomiting, and abdominal pain) associated with dehydration and the necessity of intravenous fluid replacement. Liquid or semiliquid fecal samples were collected in plastic bottles by health personnel during hospitalization, and stored briefly in the hospital at 4°C until transport to the LVCA, where they were transferred to freezers at -20°C for viral identification.

### Statistical analysis

The positivity rates for distinct enteric viruses in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children were compared through the Fisher's exact test (two-tailed). Viral loads among HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative patients, as well as among HIV-1 seropositive children with CD4<sup>+</sup> T lymphocyte count below and above 200 cells/mm<sup>3</sup> were compared with the Kruskal-Wallis test. Statistical significance was established at  $p < 0.05$ .

### Nucleic acid purification, detection and characterization of enteric viruses

Viral nucleic acids were purified from stool samples stored at -20°C. 140µL fecal suspensions (10%v/v) were prepared in Tris-calcium buffer (Tris/HCl/Ca<sup>2+</sup>, pH 7.2). The extraction of viral DNA and RNA was performed using the methodology of the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN<sup>®</sup>, Valencia, CA, USA). RNA was transcribed to complementary DNA (cDNA) using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Aliquots were immediately stored at -80°C. In each extraction procedure RNase/DNase-free water was used as negative control.

Except for RVA, which were detected through enzyme immunoassay kits (EIARA<sup>®</sup>, Biomanguinhos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; Premier Rotaclone<sup>®</sup>, Meridian Bioscience Inc, Cincinnati, Ohio, USA or Ridascreen Rotavirus<sup>®</sup>, R-Biopharm, Darmstadt, Hesse, Germany) and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) [36], and genotyped by semi-nested multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the other enteric viruses (NoV, HAstV, HAdV and HBoV) were detected through PCR or RT-PCR with sets of primers that amplify specific regions used for viral detection and characterization (Table 1). PCR amplicons were purified using QIAquick Gel Extraction Kit and PCR Purification Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. The purified DNA amplicons were sequenced using the BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and ABI Prism 3100 Genetic Analyser sequencer (both from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were edited and aligned using BioEdit Sequence Alignment Editor Program (Hall, 1999) and subsequently compared to those available in GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). For NoV, genotyping was assigned using an online genotyping tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) and the strains were named, with the genotype of the polymerase indicated with an uppercase letter p [11,12].

The nucleotide sequences obtained in this study were submitted to the NCBI (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and received accession numbers: KY611586-KY611611; MF150192-MF150203; KY882298-KY882312; KY910901-KY910941; KY753477-753502; MF034109-MF034119; MF034120-MF034125; MF156863-MF156875; MF156863-MF156866; MF156867-MF156875.

**Table 1. Oligonucleotide primers and probes used for viral detection, quantification and molecular characterization.**

Virus	Primer	Genomic region	References
RVA <sup>a</sup>	9con1, 9con2, 9T1-1 (G1), 9T1-2 (G2), 9T1-3P (G3), 9T1-4 (G4), 9T-9B (G9), FT5 (G5)	VP7	[36,37,38,39,40]
	4con2, 4con3, 1T1, 1T1-Wa, 1T1-VN P[8], 2T1 P[4], 3T1 P[6], 4T1 P[9], 5T1 P[5]	VP4	
RVA <sup>b</sup>	NSP3F, NSP3R, NSP3P	NSP3	[41]
NoV <sup>a</sup>	GI: Mon 432, Mon 434	Region B (polymerase)	[42]
	GII: Mon 431, Mon 433		
	GI: Cap A, CapB1, CapB3	Region D (Capsid)	[43]
	GII: Cap C, CapD1, CapD3		
	GII: Mon431, G2SKR	ORF1-2 junction	[42,44]
	GII: COG2F, G2SKR	5'ORF2 junction	[44,45]
NoV <sup>b</sup>	GI: COG 1, COG1R, RING1cP	ORF1-2 junction	[45]
	GII: COG 2F, COG2R, RING2P		
HAsV <sup>a</sup>	Mon 269, Mon 270	ORF-2	[46]
HAsV <sup>b</sup>	AstVF, AstVR, AstVP	ORF1b-ORF2 junction	[47]
HAdV <sup>a</sup>	Hex1deg, Hex2deg	Hexon	[48]
HAdV <sup>b</sup>	AdF, AdR, Adp1	Hexon	[49]
HBoV <sup>a</sup>	AK-VP-F1, AK-VP-R1	VP1/2	[22]
	AK-VP-F2, AK-VP-R2		
HBoV <sup>b</sup>	HoV1F, HBoV1R, HBoV234F, HBoV 24R, HBoV3R, H1234probe	UTR-NS1 junction	[50]

A rotavirus (RVA), norovirus (NoV), human adenovirus (HAdV), human astrovirus (HAsV) and human bocavirus (HBoV).

<sup>a</sup>Primes used for molecular detection and characterization.

<sup>b</sup> Primes and probes used for detection and quantification (qPCR).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183196.t001>

### Quantification of viral loads

A quantitative PCR (qPCR) was performed for detection and quantification of RVA, NoV, HAsV, HAdV and HBoV according to previously described protocols (Table 1). All qPCR reactions were carried out in an ABI PRISM 7500<sup>®</sup> Real-Time System v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). All assays were performed with TaqMan universal master mix<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA). Undiluted and 10-fold dilutions of the nucleic acid and cDNA were analyzed in duplicated and concentrations were estimated as the mean of data obtained, correcting for the dilution analyzed. Amplifications were performed in a thermocycler programmed as follows: incubation at 50°C for 2 min to activate UNG, initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles at 95°C for 15s and 60°C for 1min. The negative control used was a PCR TaqMan master mix without DNA.

### Results

#### Detection rates of enteric viruses and genotype distribution in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative patients

Among HIV-1 seropositive children, 148/200 (74%) were infected with at least one virus, versus 80/125 (64%) among HIV-1 seronegative children. As presented in Table 2, infections with NoV (19% vs. 9.6%;  $p < 0.001$ ), HBoV (14% vs. 7.2%;  $p = 0.042$ ) and HAdV (30.5% vs. 14.4%;  $p < 0.001$ ) were significantly more frequent among HIV-1 seropositive children. On the other hand, RVA was significantly less frequent among HIV-1 seropositive patients with DD (6.5% vs. 20%;  $p < 0.001$ ). Similarly, frequency of infection with HAsV was lower among HIV-seropositive children (5.5% vs. 12.8%;  $p = 0.018$ ).

**Table 2. Enteric virus detection in HIV-1 seropositive children and HIV-1 seronegative children hospitalized with diarrheal diseases by age group in Rio de Janeiro, Brazil.**

	Fecal samples from 123 HIV-1 seropositive children (n = 200 samples)	Fecal samples from 125 HIV-1 seronegative children (n = 125 samples)	p-value <sup>a</sup>
<b>Virus/Age group</b>			
<b>Group A rotavirus</b>			
0–24 months	10/69 (14.5%)	21/62 (33.9%)	0.008
25–60 months	0/57 (0%)	4/35 (11.4%)	0.018
>60 months	3/74 (4.1%)	0/28 (0%)	0.377
Total	13/200 (6.5%)	25/125 (20%)	<0.001
<b>Norovirus</b>			
0–24 months	9/69 (13%)	5/62 (8.1%)	0.263
25–60 months	7/57 (12.3%)	4/35 (11.4%)	0.589
>60 months	19/74 (25.7%)	3/28 (10.7%)	0.081
Total	38/200 (19%)	12/125 (9.6%)	0.033
<b>Human astrovirus</b>			
0–24 months	4/69 (5.8%)	11/62 (17.7%)	0.030
25–60 months	3/57 (5.3%)	3/35 (8.6%)	0.413
>60 months	4/74 (5.4%)	2/28 (7.1%)	0.527
Total	11/200 (5.5%)	16/125 (12.8%)	0.018
<b>Human bocavirus</b>			
0–24 months	11/69 (15.9%)	5/62 (8.1%)	0.133
25–60 months	7/57 (12.3%)	1/35 (2.9%)	0.117
>60 months	10/74 (13.5%)	3/28 (10.7%)	0.497
Total	28/200 (14%)	9/125 (7.2%)	0.042
<b>Human adenovirus</b>			
0–24 months	16/69 (23.2%)	13/62 (21%)	0.463
25–60 months	27/57 (47.4%)	4/35 (11.4%)	<0.001
>60 months	18/74 (24.3%)	1/28 (3.6%)	0.011
Total	61/200 (30.5%)	18/125 (14.4%)	<0.001

<sup>a</sup>Fisher’s exact test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183196.t002>

Table 3 presents genotype distribution of different enteric viruses in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative patients. It was observed that, among children infected with RVA, G1, G2, G3 and G9 genotypes were detected in HIV-1 seropositive, while G1, G2, G3, G4, G5 and G9 genotypes were in HIV-1 seronegative children. The P[4] and P[8] genotypes were detected in HIV-1 seropositive and seronegative subjects. The combinations G1P[8] and G9P[8] predominated in both groups. Among children in whom NoV was detected, a great diversity of genotypes was observed. Genogroup II was the most frequently identified both in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative patients, with a predominance of GII.4 and GII.12 in HIV-1 seropositive and GII.4 in HIV-1 seronegative children. GII.4 variants detected were Den Haag\_2006b and US95\_96 among HIV-1 seropositive children whereas among HIV-1 seronegative children were Kaiso\_2003, Asia\_2003 and Den Haag\_2006b. NoV recombinant genotypes GII.Pa-GII.3, GII.P12-GII.10 and GII.P7-GII.6 were detected among HIV-1 seropositive

**Table 3. Genotype distribution of different enteric viruses in fecal samples obtained from 123 HIV-1 seropositive children (n = 200 fecal samples) and 125 HIV-1 seronegative children (n = 125 fecal samples) hospitalized with diarrheal diseases in Rio de Janeiro, Brazil.**

	Fecal samples obtained from HIV-1 seropositive children	Fecal samples obtained from HIV-1 seronegative children
<b>Group A rotavirus genotypes</b>	<b>n = 13</b>	<b>n = 25</b>
G1P[8]	4 (30.8%)	8 (32%)
G2P[4]	3 (23.1%)	1 (4%)
G2P[8]	0 (0%)	1 (4%)
G3P[NT]	0 (0%)	1 (4%)
G3P[8]	1 (7.7%)	0 (0)
G4P[8]	0 (0%)	1 (4%)
G5P[8]	0 (0%)	2 (8%)
G9P[8]	5 (38.5%)	11 (44%)
<b>Norovirus genotypes</b>	<b>n = 38</b>	<b>n = 12</b>
GI (not typed)	1 (2.6%)	1 (8.3%)
GI.2	1 (2.6%)	0 (0%)
GI.3	1 (2.6%)	0 (0%)
GII (not typed)	6 (15.8%)	3 (25%)
GII.2	3 (7.9%)	0 (0%)
GII.3	1 (2.6%)	0 (0%)
GII.4 US95_96	1 (2.6%)	0 (0%)
GII.4 Kaiso_2003	0 (0%)	3 (25%)
GII.4 Asia_2003	0 (0%)	2 (16.7%)
GII.4 Den_Haag_2006b	1 (2.6%)	2 (16.7%)
GII.6	3 (7.9%)	0 (0%)
GII.7	0 (0%)	1 (8.3%)
GII.10	1 (2.6%)	0 (0%)
GII.12	6 (15.8%)	0 (0%)
GII.14	1 (2.6%)	0 (0%)
GII.Pa-GII.3	1 (2.6%)	0 (0%)
GII.P4-GII.4	1 (2.6%)	0 (0%)
GII.P4 US95_96-GII.4	1 (2.6%)	0 (0%)
GII.P4-GII.4 US95_96	2 (5.3%)	0 (0%)
GII.P7-GII.6	4 (10.5%)	0 (0%)
GII.P7-GII.7	2 (5.3%)	0 (0%)
GII.P12-GII.10	1 (2.6%)	0 (0%)
<b>Human astrovirus genotypes</b>	<b>n = 11</b>	<b>n = 16</b>
1	10 (90.9%)	8 (50%)
2	0 (0%)	3 (18.7%)
3	0 (0%)	2 (12.5%)
Not typed	1 (9.1%)	3 (18.7%)
<b>Human bocavirus genotypes</b>	<b>n = 28</b>	<b>n = 9</b>
1	14 (50%)	6 (66.7%)
2	8 (28.6%)	1 (11.1%)
3	3 (10.7%)	1 (11.1%)
4	1 (3.6%)	0 (0%)
Not typed	2 (7.1%)	1 (11.1%)

(Continued)

Table 3. (Continued)

	Fecal samples obtained from HIV-1 seropositive children n = 61	Fecal samples obtained from HIV-1 seronegative children n = 18
<b>Human adenovirus genotypes</b>		
A-12	3 (4,9%)	1 (5,6%)
A-31	0 (0%)	1 (5,6%)
B-3	2 (3,3%)	0 (0%)
B-7	1 (1,6%)	2 (11,1%)
C-1	2 (3,3%)	0 (0%)
C-2	6 (9,8%)	3 (16,7%)
C-6	1 (1,6%)	0 (0%)
D	10 (16,4%)	2 (11,1%)
F-40	30 (49,2%)	7 (38,9%)
F-41	6 (9,8%)	2 (11,1%)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183196.t003>

children, with GII.P7-GII.6 being the most detected. HAsV genotype 1 was the most frequent both in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative subjects. In HIV-1 seronegative patients, HAsV 2 was the second most detected virus followed by HAsV3. HBoV genotype 1 was the most prevalent in both groups and genotype 2 the second most detected in HIV-1 seropositive children. Among HAdV positive patients, non-enteric species (A, B, C or D) were detected frequently in diarrhetic feces from HIV-1 seropositive (25/61 [41%]) and HIV-1-seronegative (9/18 [50%]) children. HAdV D was the second most detected among HIV-1 seropositive children losing only to HAdV- F40. Concerning enteric HAdV types, F40 was detected more frequently than F41 in both groups. All not typed samples presented low viral load by qPCR and failed to attempt genotyping by PCR.

### Multiple viral agents infecting HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children

As presented in Table 4, 33/200 (16.5%) HIV-1 seropositive patients were excreting more than one enteric virus in fecal samples. In this group, co-infections with three enteric viruses, such as NoV, HBoV and HAdV (n = 2) and NoV, HAsV and HAdV (n = 2) were identified. The rate of infection with more than one virus was 17/125 (13.6%) in the HIV-1 seronegative group, triple infection (NoV + HAsV + HBoV) being observed in only one patient.

### Viral load of enteric viruses in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children

As demonstrated in Fig 1, the median viral load of HAsV in feces was significantly higher among HIV-1 seropositive children compared to HIV-1 seronegative children (p = 0.012). Concerning children infected with RVA, NoV, HBoV and HAdV, no statistically significant differences were observed in the medians of viral loads in feces when comparing HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children. Comparing viral loads of distinct enteric viruses in HIV-1 seronegative patients, it was observed that RVA presented the higher median (5.81 [IQR = 5.53–6.62] log<sub>10</sub> copies/g). In this group, median viral load in feces for NoV, HAsV, HBoV and HAdV reached 2.72 (IQR = 0.69–3.51), 1.29 (IQR = 1.17–4.99), 4.72

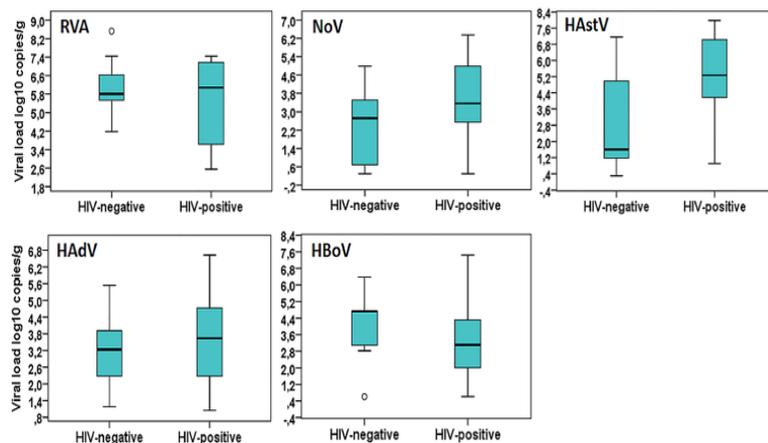
**Table 4. Detection of multiple enteric viruses in fecal samples from 123 HIV-1 seropositive children (n = 200 fecal samples) and 125 HIV-1 seronegative children (n = 125 fecal samples) hospitalized with diarrheal diseases in Rio de Janeiro, Brazil.**

No. of viruses	Virus combination in fecal samples	Fecal samples from 123 HIV-1 seropositive children (n = 200 samples)	Fecal samples from 125 HIV-1 seronegative children (n = 125 samples)
Two	HAsTV + HBoV	1 (0.5%)	1 (0.8%)
	HAsTV + HAdV	4 (2%)	3 (2.4%)
	HBoV + HAdV	6 (3%)	0 (0%)
	NoV + HAsTV	0 (0%)	1 (0.8%)
	NoV + HBoV	5 (2.5%)	1 (0.8%)
	NoV + HAdV	6 (3%)	2 (1.6%)
	RVA + HAsTV	0 (0%)	4 (3.2%)
	RVA + HBoV	3 (1.5%)	1 (0.8%)
	RVA + HAdV	1 (0.5%)	2 (1.6%)
	RVA + NoV	2 (1%)	1 (0.8%)
	Total no. of double infections (%)	28 (14%)	16 (12.8%)
Three	HAsTV + HBoV + HAdV	1 (0.5%)	0 (0%)
	NoV + HAsTV + HBoV	0 (0%)	1 (0.8%)
	NoV + HAsTV + HAdV	2 (1%)	0 (0%)
	NoV + HBoV + HAdV	2 (1%)	0 (0%)
		Total no. of triple infections (%)	5 (2.5%)

Rotavirus A (RVA), norovirus (NoV), human adenovirus (HAdV), human astrovirus (HAsTV) and human bocavirus (HBoV);

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183196.t004>

(IQR = 3.07–4.72), and 3.23 (IQR = 2.27–3.90) log<sub>10</sub> copies/g, respectively. RVA also presented the higher median viral load among HIV-1 seropositive children: 6.08 (IQR = 3.36–7.17) log<sub>10</sub> copies/g. Among HIV-1 seropositive patients, viral loads in feces were as follows: NoV, 3.36 (IQR = 2.54–4.99), HAsTV, 5.26 (4.18–7.43), HBoV, 3.09 (2–4.31), HAdV, 3.63 (2.27–4.72) log<sub>10</sub> copies/g. In HIV-1-seropositive patients, median viral loads of enteric (types F-40 and F-41) and non-enteric (types A-12, A-31, B-3, B-7, C-1, C-2, C-6, and D) HAdV were similar (3.63 [IQR = 2.73–4.53] vs. 3.24 [IQR = 2–5.28], p = 0.210) (not shown).



**Fig 1. Fecal viral loads of enteric viruses in HIV-1 seropositive and seronegative children hospitalized with diarrheal diseases in Rio de Janeiro, Brazil.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183196.g001>

**Table 5. Rate of detection and fecal viral load of different enteric virus in fecal samples obtained from HIV-1 seropositive children by level of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte count in Rio de Janeiro, Brazil.**

	CD4 T lymphocytes < 200 cells/mm <sup>3</sup> (n = 49 fecal samples)	CD4 T lymphocytes ≥ 200 cells/mm <sup>3</sup> (n = 72 fecal samples)	P-value
<b>Group A rotavirus</b>			
Rate of detection; No. Positive / No. tested (% positive)	4 (8.2%)	3 (4.2%)	0.439 <sup>a</sup>
Median viral load in log <sub>10</sub> copies/g (IQR)	6.62 (5.81–7.30)	6.08 (3.63–7.16)	0.471 <sup>b</sup>
<b>Norovirus</b>			
Rate of detection; No. Positive / No. tested (% positive)	18 (36.7%)	8 (11.1%)	0.001 <sup>a</sup>
Median viral load in log <sub>10</sub> copies/g (IQR)	3.90 (2.54–4.99)	2.82 (1.72–5.26)	0.367 <sup>b</sup>
<b>Human astrovirus</b>			
Rate of detection; No. Positive / No. tested (% positive)	0 (0%)	4 (5.6%)	0.146 <sup>a</sup>
Median viral load in log <sub>10</sub> copies/g (IQR)	-	4.72 (3.23–6.62)	-
<b>Human bocavirus</b>			
Rate of detection; No. Positive / No. tested (% positive)	12 (24.5%)	7 (9.7%)	0.041 <sup>a</sup>
Median viral load in log <sub>10</sub> copies/g (IQR)	3.09 (2.27–4.18)	2.82 (1.46–5.53)	0.831 <sup>b</sup>
<b>Human adenovirus</b>			
Rate of detection; No. Positive / No. tested (% positive)	13 (26.5%)	26 (36.1%)	0.321 <sup>a</sup>
Median viral load in log <sub>10</sub> copies/g (IQR)	3.36 (1.73–4.36)	4.01 (3.27–4.89)	0.189 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Fisher's exact test

<sup>b</sup>Kruskal-Wallis test

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183196.t005>

### Frequency of infection with enteric viruses and viral loads by level of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte count

From 200 HIV-1 seropositive, DD-related hospitalizations, we could assess CD4<sup>+</sup> T lymphocyte count in 121 children. From these, 49 had <200 cells/mm<sup>3</sup> and 72 presented a count ≥200 cells/mm<sup>3</sup>. It was examined whether among HIV-1 seropositive children, those with a CD4<sup>+</sup> T lymphocyte count below 200 cells/mm<sup>3</sup> had a different enteric virus profile than children with a count above 200 cells/mm<sup>3</sup>. Similar detection rates were observed for RVA, HAstV and HAdV, whilst NoV and HBoV were significantly more frequent among children exhibiting a CD4<sup>+</sup> T lymphocyte count below 200 cells/mm<sup>3</sup>.

Differences in viral loads in both groups were not statically significant for distinct viruses (Table 5).

### Discussion

The present study explores the diversity of viral agents in HIV-1 seropositive patients hospitalized with DD, comparing their etiological profile with a group of HIV-1 seronegative children. In this sense, the initial findings were significantly higher NoV, HBoV and HAdV detection rates in the HIV-1 seropositive group. RVA and HAstV were more frequent among HIV-1 seronegative children. In the present study, the opportunistic character of NoV may be evidenced by the fact that, among HIV-1 seropositive children, its positivity rate was more than 3 times higher among patients with CD4 T lymphocyte counts <200 cells/mm<sup>3</sup>. Despite viral loads being higher among HIV-1 seropositive children, and particularly among those more severely immunocompromised, differences were not statistically significant. In Brazil, NoV has been associated with DD in HIV-1 positive patients [29].

Our results confirm the detection of different genotypes in this group as well as demonstrating the high genetic diversity among HIV-1 seropositive children. Recombinant NoV

circulation has been observed when the combined characterization of both regions of the polymerase and capsid are used. Using both regions we characterized recombinant strains (GII.Pa-GII.3, GII.P12-GII10 and GII.P7-GII.6) for the first time in HIV-1 seropositive children in Brazil. The high genetic diversity of NoV has been described among HIV-1 seronegative individuals [51]. Our data reaffirm that NoV is an important agent of DD in HIV-1 seropositive children in Brazil. NoV has been associated with DD in HIV positive patients, and in some studies it has been detected more frequently in this group, as demonstrated in Tanzania [52]. The importance of NoV as a cause of hospitalization and DD-associated death in HIV-1 seropositive children was also demonstrated in South Africa [53]. In Venezuela it was observed that NoV excretion is significantly more frequent in HIV-1 seropositive children, regardless of whether or not they are suffering from DD [34]. Frequent NoV infection in HIV-1 seropositive children with and without DD has also been reported in Kenya in a study that points to the high genetic diversity of NoV in HIV-1 seropositive children [54].

The present study suggests that HBoV is excreted more frequently in HIV-1 seropositive children than in HIV-1 seronegative children. Cases of HBoV co-infections with other enteric viral agents were common and the most frequent HBoV genotypes identified were 1, 2 and 3. Interestingly, among HIV-1 seropositive children HBoV, like NoV, was significantly more frequent in the group with CD4 T lymphocyte counts  $<200$  cells/mm<sup>3</sup>. HBoV is an emerging pathogen, considered as a potential DD agent. Its clinical and epidemiological importance as a DD agent has not yet been fully clarified. HBoV has been identified in respiratory secretion of HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative patients with acute respiratory infections [55, 56] and in the feces of HIV-1 seropositive patients in Brazil [35, 57]. Additional studies should be performed to more accurately characterize the role of HBoV as an opportunistic agent in immunocompromised children.

This study demonstrated that HAdV is detected more frequently in HIV-1 seropositive than in HIV-1 seronegative patients and therefore presents an opportunistic behavior. Studies from Brazil report HAdV excretion by HIV-1 seropositive children with and without DD [58]. HAdV is a common cause of pediatric DD, also causing respiratory infections. In immunocompromised patients, other infections, especially CMV, may coexist with HAdV. HAdV associated colitis is a clinical entity characterized by persistent diarrhea described in HIV-1 seropositive patients in the pre-HAART era [26, 27, 59]. For the first time in Brazil, we are reporting enteric HAdV in HIV-1 seropositive patients. In this study, the enteric HAdV type F-40 was detected in almost one-half of HAdV-1 positive fecal samples. However, a great diversity of types was observed, some not commonly associated with DD. Similar viral loads of enteric and non-enteric HAdV were observed, suggesting comparable replication intensity in the digestive tract. Among HIV-1 seropositive children, HAdV was detected with similar frequency and viral load among patients with CD4<sup>+</sup> T lymphocyte counts below and above  $<200$  cells/mm<sup>3</sup>.

Results from this study suggest that RVA is a pathogen related neither to HIV-infection, nor to immunodeficiency. RVA is actually a significantly more common pathogen in children with DD hospitalized in a general pediatric hospital with no underlying diseases or complex co-morbidities such as AIDS, as demonstrated in Tanzania [33]. Nevertheless, RVA is also detected in HIV-positive children, particularly among those younger than 24 months. RVA genotype distribution was similar, with predominance of G1P[8] and G9P[8] both in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children. RVA is a common cause of DD in pediatric patients, worldwide. In the last decade, its detection rate in children with DD has been reduced due to vaccination with monovalent and pentavalent vaccines in countries such as Brazil, where universal vaccination with the monovalent vaccine has been implemented in 2006 [6]. Therefore, in this study, children recruited until 2006 were not vaccinated with the monovalent

rotavirus vaccine. The monovalent rotavirus vaccine is not indicated for immunocompromised HIV-1 seropositive children ( $CD4^+$  T lymphocyte counts  $<200$  cells/ $mm^3$ ). From 2006 to 2010, vaccine coverage ranged from 70% a 90% in Rio de Janeiro, for the cohort of children born after March 2006.

HAsV was also more frequent among HIV-1 seronegative children. Despite this, viral load was significantly higher among HIV-1 seropositive children when infected by HAsV, regardless of  $CD4^+$  T lymphocyte count. HAsV has been detected in HIV-1 seropositive children [31], but its importance as a DD agent in this group has not been established.

Data from this study demonstrate that viral agents are often found in HIV-1 seropositive children hospitalized with DD. As a limitation of this study we highlight the fact of having analyzed children with severe forms of DD, which motivated the hospitalizations, providing an etiological profile of the viral agents in this segment of patients. However, the circulation of enteric viruses in asymptomatic children has been reported, which is important to the DD dynamic of transmission. Thus, enteric viruses should be considered an important cause of DD in this group, along with pathogens more classically associated with intestinal infections in immunocompromised hosts. Management of hospitalized HIV-1 seropositive children with DD should consider enteric viral agents.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Silvana Augusta Rodrigues Portes, Filipe Anibal Carvalho-Costa, Marize Pereira Miagostovich, José Paulo Gagliardi Leite, Eduardo de Mello Volotão.

**Data curation:** Silvana Augusta Rodrigues Portes, Filipe Anibal Carvalho-Costa, Monica Simões Rocha, Eduardo de Mello Volotão.

**Formal analysis:** Silvana Augusta Rodrigues Portes, Filipe Anibal Carvalho-Costa.

**Funding acquisition:** Marize Pereira Miagostovich, José Paulo Gagliardi Leite, Eduardo de Mello Volotão.

**Investigation:** Silvana Augusta Rodrigues Portes, Filipe Anibal Carvalho-Costa, Monica Simões Rocha, Tulio Machado Fumian, Adriana Gonçalves Maranhão, Rosane Maria de Assis, Maria da Penha Trindade Pinheiro Xavier, Eduardo de Mello Volotão.

**Methodology:** Silvana Augusta Rodrigues Portes, Filipe Anibal Carvalho-Costa, Monica Simões Rocha, Marize Pereira Miagostovich, José Paulo Gagliardi Leite, Eduardo de Mello Volotão.

**Project administration:** Eduardo de Mello Volotão.

**Resources:** Silvana Augusta Rodrigues Portes, Filipe Anibal Carvalho-Costa, Myrna Santos Rocha, Marize Pereira Miagostovich, José Paulo Gagliardi Leite, Eduardo de Mello Volotão.

**Supervision:** Filipe Anibal Carvalho-Costa, Eduardo de Mello Volotão.

**Validation:** Silvana Augusta Rodrigues Portes, Monica Simões Rocha.

**Visualization:** Silvana Augusta Rodrigues Portes, Filipe Anibal Carvalho-Costa, Marize Pereira Miagostovich, Eduardo de Mello Volotão.

**Writing – original draft:** Silvana Augusta Rodrigues Portes.

**Writing – review & editing:** Silvana Augusta Rodrigues Portes, Filipe Anibal Carvalho-Costa, Marize Pereira Miagostovich, José Paulo Gagliardi Leite, Eduardo de Mello Volotão.

## References

1. Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* 2010; 375: 969–1987.
2. Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan I, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet*. 2015; 385(9966):430–440. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61698-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61698-6) PMID: [25280870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25280870/)
3. Clark B, McKendrick M. 2004. A review of viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis* 17(5):461–469. PMID: [15353966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15353966/)
4. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog*. 2009; 5:e1000391. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000391> PMID: [19381259](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19381259/)
5. Drexler JF, Baumgarte S, de Souza Luna LK, Eschbach-Bludau M, Lukashev AN, Drosten C. Aichi virus shedding in high concentrations in patients with acute diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1544–48. <https://doi.org/10.3201/eid1708.101556> PMID: [21801647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21801647/)
6. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD; World Health Organization—Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000–2013. *Clin Infect Dis*. 2016; 62 Suppl 2:S96–S105.
7. WHO (World Health Organization). Global rotavirus information and surveillance bulletin. Reporting period: January through December 2010. Vol.4. Geneva, Switzerland. 2011.
8. Mesquita JR, Barclay L, Nascimento MS, Vinje J. Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16:980–82.
9. Tse H, Lau SK, Chan WM, Choi GK, Woo PC, Yuen KY. Complete genome sequences of novel canine noroviruses in Hong Kong. *J Virol*. 2012; 86:9531–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.01312-12> PMID: [22879606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22879606/)
10. Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(2):373–81. <https://doi.org/10.1128/JCM.01535-14> PMID: [24989606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24989606/)
11. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort HV, Peñaranda S, Oberste MS, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol*. 2011; 51:121–125. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.03.006> PMID: [21514213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21514213/)
12. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinje J, White PA, Hansman G, et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol*. 2013; 158:2059–68. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1708-5> PMID: [23615870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23615870/)
13. Bosch A, Pintó RM, Guix S. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2014 27(4):1048–74. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-14> PMID: [25278582](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25278582/)
14. Vu DL, Bosch A, Pintó RM, Guix S. Epidemiology of Classic and Novel Human Astrovirus: Gastroenteritis and Beyond. *Viruses*. 2017; 9(2).
15. Moyo SJ, Hanevik K, Blomberg B, Kommedal O, Nordbo SA, Maselle S, Langeland N. Prevalence and molecular characterisation of human adenovirus in diarrhoeic children in Tanzania; a case control study. *BMC Infect Dis*. 2014 12; 14:666. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0666-1> PMID: [25495029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25495029/)
16. La Rosa G, Della Libera S, Petricca S, Iaconelli M, Donia D, Saccucci P, et al. Genetic Diversity of Human Adenovirus in Children with Acute Gastroenteritis, Albania, 2013–2015. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:142912. <https://doi.org/10.1155/2015/142912> PMID: [26339589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26339589/)
17. Ghebremedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2014; 4(1):26–33.
18. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:12891–96 <https://doi.org/10.1073/pnas.0504666102> PMID: [16118271](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16118271/)
19. Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaikat S, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis*. 2009; 199:196–200. <https://doi.org/10.1086/595831> PMID: [19072716](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19072716/)
20. Lau SK, Yip CC, Que TL, Lee RA, Au-Yeung RK, Zhou B, et al. Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong. *J Infect Dis*. 2007; 196:986–93. <https://doi.org/10.1086/521310> PMID: [17763318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17763318/)
21. Campe H, Hartberger C, Sing A. Role of Human Bocavirus infections in outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Virol*. 2008; 43:340–42 <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.07.014> PMID: [18835213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18835213/)
22. Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis*. 2010; 201:1633–43. <https://doi.org/10.1086/652416> PMID: [20415538](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20415538/)

23. Grohmann GS, Glass RI, Pereira HG, Monroe SS, Hightower AW, Weber R, et al. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 1993; 329(1): 14–20. <https://doi.org/10.1056/NEJM199307013290103> PMID: 8099429
24. Arvelo W, Kim A, Creek T, Legwaila K, Puh N, Johnston S, et al. Case-control study to determine risk factors for diarrhea among persons during a large outbreak in a country with a high prevalence of HIV infection. *Int J Infect Dis* 2010; 14: e1002–07. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.06.014> PMID: 20932791
25. Groome MJ, Madhi SA. Five-year cohort study on the burden of hospitalisation for acute diarrhoeal disease in African HIV-infected and HIV-uninfected children: potential benefits of rotavirus vaccine. *Vaccine* 2012; 30 Suppl 1:A173–8.
26. Thomas PD, Pollok RC, Gazzard BG. Enteric viral infections as a cause of diarrhoea in the acquired immunodeficiency syndrome. *HIV Med* 1999; 1(1):19–24. PMID: 11737325
27. Pollok RC. Viruses causing diarrhoea in AIDS. *Novartis Found Symp*. 2001; 238:276–83; discussion 283–8. PMID: 11444032
28. Rossit ARB, Gonçalves ACM, Franco C, Machado RLD. Etiological agents of diarrhea in patients infected by the human immunodeficiency virus-1: A review. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2009; 51(2):59–65. PMID: 19390732
29. Gonçalves AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD, Yassaka MB, Moran LC, Fraga VD, et al. Calicivirus and *Giardia lamblia* are associated with diarrhea in human immunodeficiency virus-seropositive patients from southeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81: 463–66. PMID: 19706916
30. González GG, Pujol FH, Liprandi F, Deibis L, Ludert JE. Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. *J med Virol* 1998; 55: 288–292. PMID: 9661837
31. Giordano MO, Martínez LC, Rinaldi D, Espul C, Martínez N, Isa MB, et al. Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. *AIDS Res. hum. Retroviruses*. 1999; 15: 1427–1432. <https://doi.org/10.1089/088922299309937> PMID: 10555105
32. Liste MB, Natera I, Suarez JA, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE. Enteric virus infections and diarrhea in healthy and human immunodeficiency virus infected children. *J clin Microbiol* 2000; 38: 2873–2877. PMID: 10921942
33. Moyo SJ, Blomberg B, Hanevik K, Kommedal O, Vainio K, Maselle SY, et al. Genetic diversity of circulating rotavirus strains in Tanzania prior to the introduction of vaccination. *PLoS One* 2014; 20; 9(5): e97562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097562> PMID: 24844631
34. Rodríguez-Guillén L, Vizzi E, Alcalá AC, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE. Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. *J Clin Virol*. 2005; 33(2):104–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.09.031> PMID: 15911425
35. Silva RC, Benati FJ, Pena GP, Santos N. Molecular characterization of viruses associated with gastrointestinal infection in HIV-positive patients. *Braz J Infect Dis*. 2010; 14(6):549–52. PMID: 21340293
36. World Health Organization. Manual of rotavirus detection and characterization methods. 2009. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70122/1/WHO\\_IVB\\_08.17\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70122/1/WHO_IVB_08.17_eng.pdf). Accessed April 15th 2016.
37. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992; 30: 1365–1373. PMID: 1320625
38. Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994; 32(5): 1338–40. PMID: 8051263
39. Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 1820–1822. PMID: 7929782
40. Fischer TK, Steinsland H, Molbak K, Ca R, Gentsch JR, Valentiner-Branth P, et al. Genotype profiles of rotavirus strains from children in a suburban community in Guinea-Bissau, Western Africa. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(1):264–7. PMID: 10618098
41. Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Puustinen L, Vesikari T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods*. 2008; 153(2):238–40. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.004> PMID: 18765254
42. Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Lüthi TM. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(4):1925–31. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1925-1931.2002> PMID: 11916714
43. Vinjé J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods*. 2004; 116(2):109–17. PMID: 14738976
44. Kojima S, Kaheyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Vir Methods*. 2002; 100: 107–14.

45. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 41(4):1548–1557. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1548-1557.2003> PMID: [12682144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12682144/)
46. Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(4):797–801. PMID: [7790440](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7790440/)
47. Dai YC, Xu QH, Wu XB, Hu GF, Tang YL, Li JD, et al. Development of real-time and nested RT-PCR to detect astrovirus and one-year survey of astrovirus in Jiangmen City, China. *Arch Virol*. 2010; 155(6):977–82. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0664-6> PMID: [20376681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20376681/)
48. Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 498–505. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.498-505.2001> PMID: [11158096](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11158096/)
49. Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(9):4523–33. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4523-4533.2002> PMID: [12200309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12200309/)
50. Kantola K, Sadeghi M, Antikainen J, Kirveskari J, Delwart E, Hedman K, et al. Real-time quantitative PCR detection of four human bocaviruses. *J Clin Microbiol* 2010; 48(11):4044–50. <https://doi.org/10.1128/JCM.00686-10> PMID: [20844210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20844210/)
51. Fumian TM, da Silva Ribeiro de Andrade J, Leite JP, Miagostovich MP. Norovirus Recombinant Strains Isolated from Gastroenteritis Outbreaks in Southern Brazil, 2004–2011. *PLoS One*. 2016; 11(4): e0145391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145391> eCollection 2016. PMID: [27116353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27116353/)
52. Moyo S, Hanevik K, Blomberg B, Kommedal O, Vainio K, Maselle S, et al. Genetic diversity of norovirus in hospitalised diarrhoeic children and asymptomatic controls in Dar es Salaam, Tanzania. *Infect Genet Evol*. 2014; 26:340–7. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.06.013> PMID: [24960396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24960396/)
53. Page NA, Groome MJ, Nadan S, Netshikweta R, Keddy KH, Poonsamy B, et al. Norovirus epidemiology in South African children <5 years hospitalised for diarrhoeal illness between 2009 and 2013. *Epidemiol Infect*. 2017; 10: 1–11.
54. Mans J, Murray TY, Kiulia NM, Mwenda JM, Musoke RN, Taylor MB. Human caliciviruses detected in HIV-seropositive children in Kenya. *J Med Virol*. 2014; 86(1):75–81. <https://doi.org/10.1002/jmv.23784> PMID: [24123054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24123054/)
55. Nunes MC, Kuschner Z, Rabede Z, Madimabe R, Van Niekerk N, Moloi J, et al. Clinical epidemiology of bocavirus, rhinovirus, two polyomaviruses and four coronaviruses in HIV-infected and HIV-uninfected South African children. *PLoS One*. 2014; 9(2):e86448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086448> PMID: [24498274](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24498274/)
56. Garbino J, Inoubli S, Mossdorf E, Weber R, Tamm M, Soccia P, et al.; Swiss HIV Cohort Study. Respiratory viruses in HIV-infected patients with suspected respiratory opportunistic infection. *AIDS*. 2008; 22(6):701–5. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282f470ac> PMID: [18356599](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18356599/)
57. Santos N, Peret TC, Humphrey CD, Albuquerque MC, Silva RC, Benati FJ, et al. Human bocavirus species 2 and 3 in Brazil. *J Clin Virol*. 2010; 48(2):127–30. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.03.014> PMID: [20382557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20382557/)
58. Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Carmona RC, Neme SN, Timenetsky MC. Rotavirus genotype G4P[8] and enteric adenovirus in HIV-positive patients with and without diarrhoea in São Paulo State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010; 104(2):165–7. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.07.023> PMID: [19729177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19729177/)
59. Yan Z, Nguyen S, Poles M, Melamed J, Scholes JV. Adenovirus colitis in human immunodeficiency virus infection: an underdiagnosed entity. *Am J Surg Pathol*. 1998; 22(9):1101–6. PMID: [9737243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9737243/)

### **4.3 Artigo 3- Recurrent infections with human adenoviruses in HIV-1 seropositive children with diarrheal disease in Brazil.**

Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao objetivo específico:

5. Avaliar a infecção recorrente, caracterizar o genótipo e a carga viral do HAdV em crianças HIV-1 soropositivas hospitalizadas e com DD entre 1997 e 2010.

Situação do manuscrito: Artigo submetido à revista científica- *Jornal de Pediatria*

Referência: Portes SA, de Mello Volotao E, Rose TL, Rocha MS, Trindade Pinheiro Xavier Mda P, de Assis RM, Fialho AM, Rocha MS, Miagostovich MP, Gagliardi Leite JP, Carvalho-Costa FA. Aichi Virus Positivity in HIV-1 Seropositive Children Hospitalized with Diarrheal Disease.

## Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	JPED_2017_442
<b>Title</b>	Recurrent infections with human adenoviruses in HIV-1 seropositive children with diarrheal disease in Brazil
<b>Short title</b>	Human adenoviruses in HIV-1 seropositive children with diarrhea
<b>Article type</b>	Original article

### Abstract

**Objective:** This study aimed to evaluate recurrent human adenoviruses (HAdV) infection in HIV-1 seropositive children hospitalized due to diarrheal disease (DD). **Methods:** We studied a cohort of 123 children aged 1 to 168 months. A total of 253 fecal samples were collected from 1997 to 2010. Recurrent HAdV infection in the gastrointestinal tract was determined by two positive fecal samples collected within a 30 days interval, HAdVs were detected, quantified and typed using PCR, qPCR and nucleotide sequencing, respectively. **Results:** Recurrent HAdV infection was detected in 11 children. Nine children were at infected with HAdV F40. HAdV F41 was detected in two patients. HAdV D, C2, A12 and B3 were identified in three, two, one and one children, respectively. Mean HAdV fecal viral loads ( $\pm$  standard deviation) in children with CD4+ T lymphocyte counts  $< 200$  cells/mm<sup>3</sup> and  $\geq 200$  cells/mm<sup>3</sup> were  $4.2 \pm 1.70$  and  $4.0 \pm 1.11$  log<sub>10</sub> copies/g ( $p=0.746$ ). Fecal viral loads were significantly higher in the first HAdV infection (mean =  $4.51 \pm 0.51$  log<sub>10</sub> copies/g) when compared to the second (mean =  $2.80 \pm 0.44$  log<sub>10</sub> copies/g) and the third (mean =  $2.54 \pm 0.63$  log<sub>10</sub> copies/g),  $p = 0.021$  and  $p = 0.034$ , respectively (Student's t-test). **Conclusions:** The present study points to the need for further investigation of intestinal infections by HAdV in children with persistent and chronic diarrhea associated with HIV-1 infection.

<b>Keywords</b>	Human adenoviruses-HAdV; HIV-1seropositive children; Diarrheal disease
<b>Corresponding Author</b>	Silvana Augusta Rodrigues Portes
<b>Corresponding Author's Institution</b>	Oswaldo Cruz Foundation, Oswaldo Cruz Institute, Laboratory of Comparative and Environmental Virology
<b>Order of Authors</b>	Silvana Augusta Rodrigues Portes, Eduardo de Mello Volotão, Mônica Simões Rocha, Adriana Gonçalves Maranhão, Myrna Santos Rocha, Marize Pereira Miagostovich, José Paulo Gagliardi Leite, Filipe Anibal Carvalho-Costa
<b>Suggested reviewers</b>	Alexandre Linhares

## Submission Files Included in this PDF

### File Name [File Type]

Portes et al. 5062017jped Cover letter.doc [Cover Letter]

Title page.docx [Title Page (with Author Details)]

Portes et al jped 5 junho 2017.docx [Manuscript (without Author Details)]

Portes et al 5062017 jpedAuthors agreement.docx [Author Agreement]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

## **Recurrent infections with human adenoviruses in HIV-1 seropositive children with diarrheal disease in Brazil**

### **Human adenoviruses in HIV-1 seropositive children**

Silvana A R Portes, MSc, [sil@ioc.fiocruz.br](mailto:sil@ioc.fiocruz.br) and [silarportes@gmail.com](mailto:silarportes@gmail.com), Eduardo M Volotão, PhD, [volotao@ioc.fiocruz.br](mailto:volotao@ioc.fiocruz.br), Mônica S Rocha, PhD, [mosrocha@ioc.fiocruz.br](mailto:mosrocha@ioc.fiocruz.br), Adriana G Maranhão, PhD, [adriana.maranhao@ioc.fiocruz.br](mailto:adriana.maranhao@ioc.fiocruz.br), Myrna S Rocha, PhD, [myrnasr@terra.com.br](mailto:myrnasr@terra.com.br), Marize P Miagostovich, PhD, [marizepm@ioc.fiocruz.br](mailto:marizepm@ioc.fiocruz.br), José P G Leite, PhD, [jpgleite@ioc.fiocruz.br](mailto:jpgleite@ioc.fiocruz.br), Filipe A Carvalho-Costa, PhD, [guaratiba@ioc.fiocruz.br](mailto:guaratiba@ioc.fiocruz.br)

All authors have registered curriculum in the Lattes Platform CNPq

Specific contribution of authors:

These authors contributed equally to this work- Silvana A R Portes, Eduardo M Volotão

Data analysis and manuscript writing- Silvana A R Portes, Eduardo M Volotão, Marize P Miagostovich, José P G Leite and Filipe A Carvalho-Costa.

Sample collection, experiments and results analysis- Silvana A R Portes, Eduardo M Volotão, Mônica S Rocha, Adriana G Maranhão and Myrna S Rocha

Conflict of Interest

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

Work developed at the Oswaldo Cruz Foundation, Oswaldo Cruz Institute, Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Silvana Augusta Rodrigues Portes: Address correspondence to this author at the Oswaldo Cruz Foundation, Oswaldo Cruz Institute, Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Pav. Helio & Peggy Pereira, Av. Brazil 4.365 - Manguinhos - 21040-360 - Rio de Janeiro - RJ – Brazil; Tel: +55 21 25621899; Fax: +55 21 25621851. [sil@ioc.fiocruz.br](mailto:sil@ioc.fiocruz.br) , [silarportes@gmail.com](mailto:silarportes@gmail.com)

Financial support: This study was sponsored by Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, National Council for Scientific and Technological Development (PAPES VI/Fiocruz-CNPq), PAEF/Fiocruz, Coordination for Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro.

Total word count of the text: 1266

Total word count of the abstract: 230

Number of tables and figures: one table and one figure

## **Abstract**

**Objective:** This study aimed to evaluate recurrent human adenoviruses (HAdV) infection in HIV-1 seropositive children hospitalized due to diarrheal disease (DD).

**Methods:** We studied a cohort of 123 children aged 1 to 168 months. A total of 253 fecal samples were collected from 1997 to 2010. Recurrent HAdV infection in the gastrointestinal tract was determined by two positive fecal samples collected within a 30 days interval, HAdVs were detected, quantified and typed using PCR, qPCR and nucleotide sequencing, respectively.

**Results:** Recurrent HAdV infection was detected in 11 children. Nine children were infected with HAdV F40. HAdV F41 was detected in two patients. HAdV D, C2, A12 and B3 were identified in three, two, one and one children, respectively. Mean HAdV fecal viral loads ( $\pm$  standard deviation) in children with CD4<sup>+</sup> T lymphocyte counts  $< 200$  cells/mm<sup>3</sup> and  $\geq 200$  cells/mm<sup>3</sup> were  $4.2 \pm 1.70$  and  $4.0 \pm 1.11$  log<sub>10</sub> copies/g ( $p=0.746$ ). Fecal viral loads were significantly higher in the first HAdV infection (mean =  $4.51 \pm 0.51$  log<sub>10</sub> copies/g) when compared to the second (mean =  $2.80 \pm 0.44$  log<sub>10</sub> copies/g) and the third (mean =  $2.54 \pm 0.63$  log<sub>10</sub> copies/g),  $p = 0.021$  and  $p = 0.034$ , respectively (Student's t-test).

**Conclusions:** The present study points to the need for further investigation of intestinal infections by HAdV in children with persistent and chronic diarrhea associated with HIV-1 infection.

## **Keywords**

Human adenoviruses-HAdV; HIV-1seropositive children; Diarrheal disease

## INTRODUCTION

Human adenoviruses (HAdVs) are non-enveloped double stranded DNA viruses belonging to the family *Adenoviridae*. HAdVs are genetically diverse agents classified into serotypes belonging to seven species (A-G) with a total of 78 types reported<sup>1</sup>.

HAdVs are etiological agents of diarrheal diseases (HAdV F40 and F41, and G52), respiratory infections (mainly species HAdV B and C), and conjunctivitis (HAdV B and D). More recently, infection with HAdVs A31, C5, D9, D36 and D37 were supposed to be a risk factor to obesity<sup>2,3</sup>. HAdVs F40 and F41 are recognized as enteric HAdVs and represent common cause of outbreaks and sporadic cases of diarrheal diseases (DD). Less frequently, non-enteric HAdVs (species A, B, C, G, and D) can be detected in fecal samples of patients with DD<sup>4,5</sup>.

After acute infection, HAdVs can persist chronically in tonsillar and adenoidal T lymphocytes, as well as in T lymphocytes of the intestinal tract, and reactivated following immunosuppression<sup>6-8</sup>. HAdV associated colitis is defined by persistent diarrhea described in HIV-1 seropositive patients, mainly during pre-highly active antiretroviral therapy (HAART) era. Additionally, HAdV can be associated with cytomegalovirus (CMV), causing chronic diarrhea<sup>9-11</sup> in those patients. Chronic shedding of HAdV was demonstrated in pediatric patients undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation and HAdV reactivation seems to be preceded by viral proliferation in the gut<sup>12</sup>.

This study aimed to evaluate recurrent HAdV infection in HIV-1 seropositive children hospitalized in a public hospital due to DD, from 1997 to 2010 in the city of Rio de Janeiro, Brazil.

## **PATIENTS AND METHODS**

### ***Study design and setting.***

This is a case series study. Cases belong to a cohort of HIV-1 seropositive children hospitalized with DD in Hospital Municipal Jesus (HMJ), a state tertiary pediatric hospital in Rio de Janeiro, Brazil, that provides specialized care to HIV-1 infected children. This cohort included 123 HIV-1 seropositive children aged 1 to 168 months, from whom 253 fecal samples were collected from January 1997 to December 2010, in order to assess the etiological profile of diarrheal diseases. This study was approved by the Ethical Research Committee of Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) (311/2006).

Recurrent HAdV infection in the gastrointestinal tract was determined by two positive fecal samples collected within at least a 30 days interval. Using these criteria, 11 pediatric patients were identified as cases, i.e. they presented repeated infections with HAdV in the context of prolonged hospitalizations due to diarrhea.

### ***Detection, quantification and characterization of HAdV in fecal samples***

Stool samples were sent from HMJ to the Rotavirus Regional Reference Laboratory/Laboratory of Comparative and Environmental Virology (LRRR/LVCA), FIOCRUZ. Viral nucleic acids were extracted from 10% (v/v) fecal suspensions in Tris-Ca<sup>++</sup> buffer (pH 7.2), using the QIAmp<sup>®</sup> viral RNA Mini kit (Qiagen<sup>®</sup>, Valencia, CA, USA). Nucleic acids were analyzed for HAdV using

qualitative PCR<sup>13</sup>. Quantitative PCR (TaqMan® real-time PCR, qPCR) was also performed, targeting the conserved region of HAdV hexon<sup>14</sup>.

Amplicons (301 bp) were purified using QIAmp® PCR Purification Kit (Qiagen®, CA, USA) and then subjected to sequencing. Both DNA strands in PCR amplicons were sequenced using ABI Prism 3100 Genetic Analyzer with Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1® (Applied Biosystem®, CA, USA). Centri-Sep columns (Princeton Separations, CA, USA) were used to purify sequenced reaction products prior to analysis in the genetic analyzer. Sequences were edited and aligned using BioEdit Sequence Alignment Editor Program (Hall, 1999) and subsequently compared to those available in GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

The nucleotide sequences are listed in the GenBank database under the accession numbers: KY910902, MF177734, MF156867, KY910903, KY910906, MF177723, KY910907, KY910908, MF156868, KY910910, MF156869, KY910913, KY910914, KY910916, KY910918, KY910922, KY910923, KY910926, KY910927, KY910929, MF177733, MF177750, MF177737, MF177739, MF177740, MF156873, MF177743, KY910933.

## **RESULTS**

Recurrent HAdV infection was detected in 11 children, from which 30 HAdV-positive samples were obtained. Table 1 summarizes clinical-epidemiological information of patients. From 11 patients, five presented two HAdV-positive samples, four presented three positive samples and two presented four HAdV-positive fecal samples. Time interval between collections of HAdV-positive samples ranged from one to 97 months.

Nine children were infected with HAdV F40. HAdV F41 was detected in two patients. HAdV D, C2, A12 and B3 were identified in three, two, one and one children, respectively. In six children, the same species/type was detected in distinct HAdV-positive children; five patients carried different species/types at different times. Eight children presented CD4<sup>+</sup> T lymphocyte counts >200 cells/mm<sup>3</sup>.

Mean HAdV fecal viral loads ( $\pm$  standard deviation) in children with CD4<sup>+</sup> T lymphocyte counts < 200 cells/mm<sup>3</sup> and  $\geq$  200 cells/mm<sup>3</sup> were  $4.2 \pm 1.70$  and  $4.0 \pm 1.11$  log<sub>10</sub> copies/g ( $p=0.746$ ). A child showing persistent HAdV-D detection presented high HAdV-viral load and CD4<sup>+</sup> T lymphocyte counts  $\leq$  100 cells/mm<sup>3</sup>. Non-enteric HAdVs presented low viral load except for A12.

Evolution of HAdV viral loads at different times is depicted in Figure 1. Fecal viral loads were significantly higher in the first HAdV infection (mean =  $4.51 \pm 0.51$  log<sub>10</sub> copies/g) when compared to the second (mean =  $2.80 \pm 0.44$  log<sub>10</sub> copies/g) and the third (mean =  $2.54 \pm 0.63$  log<sub>10</sub> copies/g),  $p = 0.021$  and  $p = 0.034$ , respectively (Student's t-test).

## **DISCUSSION**

This study demonstrates that HAdV may be associated with chronic and persistent diarrhea in HIV-1 seropositive children. In this sense, it was demonstrated that in a part of the studied children, diarrheic fecal samples collected at variable intervals during prolonged hospitalizations are repeatedly positive for HAdV.

Episodes of diarrhea are one of the major complications in the course of HIV-1 infection. Diarrhea in patients with AIDS is associated with weight loss,

malnutrition and progressive impairment of their general health condition, contributing to cachexia and death, especially in pre-HAART era. In HIV-1 seropositive patients, diarrhea is often caused by opportunistic agents such as microsporidia and *Cryptosporidium* sp<sup>15</sup>, as well as CMV and other agents such as Herpes simplex virus, *Histoplasma capsulatum* and *Mycobacterium avium-intracellulare*.

Our study demonstrated that in the majority of children with persistent infection, enteric species/types (F40 and F41) were the most frequently identified. However, some diversity could be observed with detection of non-enteric species such as A12, B3, C2 and D. HAdV Species not usually associated with DD are observed in children with diarrhea in Brazil and in other countries<sup>4,16</sup>. HAdV has been described as an opportunistic agent, causing diarrhea in patients with AIDS. Studies from Brazil report that HAdV is excreted asymptotically by HIV-1seropositive children<sup>17</sup>. HAdV is also a very important pathogen in children receiving stem cells and solid organ transplantation, which demonstrates its importance in immunosuppressed patients<sup>18-21</sup>. Recent studies have demonstrated sites of latent infection by HAdV, from which there may be dissemination in cases of immunosuppression<sup>6,7,21</sup>. It is shown that the lymphoid tissue of the gut can maintain the infection for prolonged periods<sup>21</sup>.

We observed that viral loads of initially detected infections were significantly higher than those of subsequent infections, suggesting activation of immune mechanisms at the intestine level, able to reduce the viral load in the course of recurrent infections. Interestingly, we did not observe differences in viral loads of HAdV in children with different degrees of immunocompromising,

as assessed by CD4<sup>+</sup> T lymphocyte counts, except for the child with persistent HAdV D detection.

The present study points for further investigation of intestinal infections by HAdV in children with persistent and chronic diarrhea associated with HIV-1 infection. It should be taken into account that there are protocols for treatment of severe and life-threatening HAdV infections especially in transplant recipients, with Cidofovir being the most commonly used drug<sup>22</sup>. The use of this drug should be considered in persistent diarrhea in HIV-1 seropositive patients in whom HAdV infection is detected.

#### Acknowledgements

The authors thank the staff at Jesus Municipal Hospital, Salles Netto Municipal Hospital and Genomic Platform of DNA sequencing PDTIS/Fiocruz.

## References

1. Ghebremedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2014 ;4(1):26-33.
2. Voss JD, Atkinson RL, Dhurandhar NV. Role of adenoviruses in obesity. *Medical Virology*. 2015; 25 (6): 379–387.
3. Xu MY, Cao B, Wang DF, Guo JH, Chen KL, Shi M, et al. Human Adenovirus 36 Infection Increased the Risk of Obesity: A Meta-Analysis Update. *Medicine (Baltimore)*. 2015 ;94(51):e2357.
4. Moyo SJ, Hanevik K, Blomberg B, Kommedal O, Nordbo SA, Maselle S, et al. Prevalence and molecular characterisation of human adenovirus in diarrhoeic children in Tanzania; a case control study. *BMC Infect Dis*. 2014;14: 666
5. Portes SA, Volotão E M, Rocha MS, Rebelo MC, Xavier MP, Assis RM, et al. A non-enteric adenovirus A12 gastroenteritis outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016; 111(6):403-6.
6. Garnett CT, Erdman D, Xu W, Gooding LR. Prevalence and quantitation of species c adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J Virol*. 2002;76:10608–16.
7. Garnett CT, Talekar G, Mahr JA, Huang W, Zhang Y, Ornelles DA, et al. Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. *J Virol*. 2009;83:2417–28.
8. Roy S, Calcedo R, Medina-Jaszek A, Keough M, Peng H, Wilson JM. Adenoviruses in lymphocytes of the human gastro-intestinal tract. *PloS One* 2011;6:e24859.

9. Thomas PD, Pollok RC, Gazzard BG. Enteric viral infections as a cause of diarrhoea in the acquired immunodeficiency syndrome. *HIV Med.* 1999;1(1):19-24.
10. Pollok RC. Viruses causing diarrhoea in AIDS. *Novartis Found Symp.* 2001; 238:276-83; discussion 283-8.
11. Yan Z, Nguyen S, Poles M, Melamed J, Scholes JV. Adenovirus colitis in human immunodeficiency virus infection: an underdiagnosed entity. *Am J Surg Pathol.* 1998; 22(9):1101-6.
12. Lion T, Kosulin K, Landlinger C, Rauch M, Preuner S, Jugovic D, et al. Monitoring of adenovirus load in stool by real-time PCR permits early detection of impending invasive infection in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2010; 24: 706–714
13. Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 498-505.
14. Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(9):4523-33.
15. Agholi M, Hatam GR, Motazedian MH. HIV/AIDS-associated opportunistic protozoal diarrhea. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013;29(1):35-41.
16. Filho EP, da Costa Faria NR, Fialho AM, de Assis RS, Almeida MM, Rocha M, et al. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and

community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *J Med Microbiol.* 2007; 56(Pt 3):313-9.

17. Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Carmona RC, Neme SN, Timenetsky MC. Rotavirus genotype G4P[8] and enteric adenovirus in HIV-positive patients with and without diarrhoea in São Paulo State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010; 104(2):165-7.

18. Hiwarkar P, Gaspar HB, Gilmour K, Jagani M, Chiesa R, Bennett-Rees N, et al. Impact of viral reactivations in the era of pre-emptive antiviral drug therapy following allogeneic haematopoietic SCT in paediatric recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2013; 48: 803–808

19. Hoffman JA. Adenovirus infections in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant.* 2009 ;14(6):625-33.

20. Ison MG, Green M, the AST Infectious Diseases Community of Practice. Adenovirus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9:S161–5.

21. Kosulin K, Geiger E, Vécsei A, Huber WD, Rauch M, Brenner E, et al. Persistence and reactivation of human adenoviruses in the gastrointestinal tract. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(4):381.e1-8.

22. Florescu DF, Pergam SA, Neely MN, Qiu F, Johnston C, Way S, et al. Safety and efficacy of CMX001 as salvage therapy for severe adenovirus infections in immunocompromised patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(5):731-8.

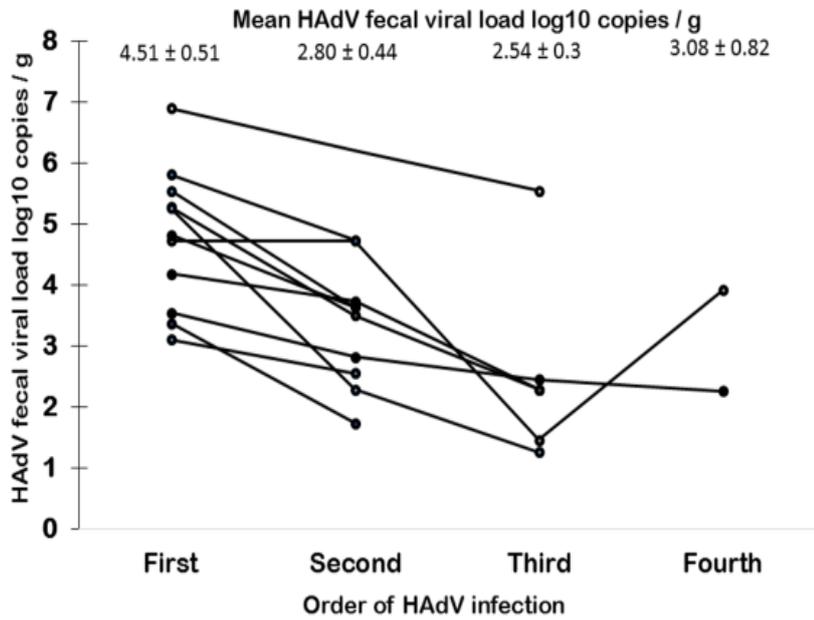
Table 1. Clinical and epidemiological information and species/types distribution of 11 HIV-1 seropositive children hospitalized with diarrheal diseases and recurrent human adenovirus infection

Patient	Age in which HAdV infection was detected (months)	Sex	Sequential HAdV species/types identified (HAdV viral load- log10 copies/g)	Antiretroviral therapy	Sequential HIV-1 viral load (log10 copies/mL)	Sequential CD4 T lymphocyte count (cells/mL)
1	16 – 113	F	F40(5.5) – F40(3.6)	3TC + D4T + RTV / AZT + 3TC + NFV	NA – 4.1	NA – 986
2	84 – 102 – 114 – 168	M	D(3.9) – C2(1.4) – F40 (4.7)- D(4.7)	3TC + D4T + NFV	5.1 – NA – NA – NA – NA	290 – NA – NA – NA
3	41 – 45	M	F40(5.8) – F40(4.3)	AZT + 3TC + NFV / AZT + 3TC + NFV + SAQ	4.5 – 3.1	1330 – 652
4	36 – 66 – 108	F	F41(4.1) – F41(3.7) – F41(2.2)	AZT + DDI	4.1 – 4.4 – 4.2	NA – 850 – 900
5	37 – 44 – 48	M	F40(2.4) – F40(5.2) – F40(3.5)	D4T + NVF + NFV / 3TC + D4T + NFV + NVP	NA – 5.8 – 6.0	NA – 5 – 600
6	16 – 36	F	C2(1.7) – F40(3.3)	AZT + DDI / AZT + 3TC	NA – NA	2460 – NA
7	17 – 28 – 59	F	F40(2.2) – F41(1.2) – D(5.2)	AZT + DDI / D4T + NVP + RTV	NA – 5.4 – 4.6	NA – NA – 1615
8	73 – 75 – 76 – 78	F	F40(3.5) – F40(2.2) – F40(2.8) – F40(2.4)	3TC + D4T + SAQ / AZT + 3TC + RTV/D4T + APV + EFV / 3TC + D4T + RTV	4.3 – 5.6 – 4.8 – 4.2	19 – 13 – 101 – NA
9	71 – 91	M	F40(3.1) – B3(2.5)	AZT + 3TC / 3TC + LPV-RTV + NVP	4.0 – 4.4	52 – 330
10	28 – 36	F	F40(3.6) – A12(4.8)	AZT + DDI	ND – 5.2	NA – 860
11	155 – 156	F	D(4.5) – D(6.8)	AZT + APV + ABC	5.4 – 5.6	100 – 30

Human adenovirus (HAdV); HIV-1= Human immunodeficiency virus type 1;

3TC = Lamivudine, D4T = Stavudine, RTV = Ritonavir, SAQ= Saquinavir, AZT = Zidovudine, LPV = Lopinavir, NFV = Nelfinavir, ABC = Abacavir, DDI = Didanosine, TDF =

Tenofovir. EFV = Efavirenz. Nevirapine=NVP. Amorennavir=AVP: NA=not assessed



**Figure 1.** Sequential evolution of human adenovirus viral load in HIV-1 seropositive children hospitalized with diarrheal diseases, from 1997-2010, in a Public hospital in Rio de Janeiro, Brazil.

#### **4.4 Artigo 4- A non-enteric adenovirus A12 gastroenteritis outbreak in Rio de Janeiro, Brazil**

Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao objetivo específico:

6. Investigar a etiologia viral desconhecida de um surto de DD na cidade do Rio de Janeiro em 2013 e realizar a genotipagem do vírus identificado.

Situação do manuscrito: Artigo publicado na revista científica- *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*

Referência: Portes SA, Volotão Ede M, Rocha MS, Rebelo MC, Xavier MP, Assis RM, Rose TL, Miagostovich MP, Leite JP, Carvalho-Costa FA. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(6):403-6. doi: 10.1590/0074-02760160030.

## A non-enteric adenovirus A12 gastroenteritis outbreak in Rio de Janeiro, Brazil

Silvana Augusta Rodrigues Portes<sup>1</sup>, Eduardo de Mello Volotão<sup>1</sup>, Monica Simões Rocha<sup>1</sup>,  
 Maria Cristina Rebelo<sup>2</sup>, Maria da Penha Trindade Pinheiro Xavier<sup>1</sup>,  
 Rosane Maria de Assis<sup>1</sup>, Tatiana Lundgren Rose<sup>1</sup>, Marize Pereira Miagostovich<sup>1</sup>,  
 José Paulo Gagliardi Leite<sup>1</sup>, Filipe Anibal Carvalho-Costa<sup>1,3/+</sup>

<sup>1</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório Central de Saúde Pública, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>3</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Escritório Técnico Regional Fiocruz Piauí, Teresina, PI, Brasil

*A gastroenteritis outbreak that occurred in 2013 in a low-income community in Rio de Janeiro was investigated for the presence of enteric viruses, including species A rotavirus (RVA), norovirus (NoV), astrovirus (HAsTV), bocavirus (HBoV), aichivirus (AiV), and adenovirus (HAdV). Five of nine stool samples (83%) from patients were positive for HAdV, and no other enteric viruses were detected. Polymerase chain reaction products were sequenced and subjected to phylogenetic analysis, which revealed four strains and one strain of non-enteric HAdV-A12 and HAdV-F41, respectively. The HAdV-A12 nucleotide sequences shared 100% nucleotide similarity. Viral load was assessed using a TaqMan real-time PCR assay. Stool samples that were positive for HAdV-A12 had high viral loads (mean  $1.9 \times 10^7$  DNA copies/g stool). All four patients with HAdV-A12 were < 25 months of age and had symptoms of fever and diarrhoea. Evaluation of enteric virus outbreaks allows the characterisation of novel or unique diarrhoea-associated viruses in regions where RVA vaccination is routinely performed.*

Key words: gastroenteritis - adenovirus - quantitative polymerase chain reaction

Acute gastroenteritis (AGE) is a common cause of morbidity and mortality in children  $\leq 5$  years of age in developing countries. Worldwide, the most common viruses responsible for AGE are rotavirus A (RVA), norovirus (NoV), adenovirus (HAdV) and astrovirus (HAsTV) (Corcoran et al. 2014). Recently, newly identified viruses, such as bocavirus (HBoV) and aichivirus (AiV), were associated with AGE; however, further studies are required to demonstrate the relative efficiency of these viruses as aetiological agents of AGE (Portes et al. 2015).

HAdVs are non-enveloped double stranded DNA viruses belonging to the family *Adenoviridae*. These viruses are associated with several pathologies, including respiratory infections, conjunctivitis and AGE. More than 50 HAdV types exist and are categorised into seven groups (A-G). HAdVs are associated with outbreaks and sporadic cases of AGE in children and adults, especially enteric viruses F40 and F41 (Lee et al. 2012). Non-enteric HAdVs are less frequently associated with AGE (Moyo et al. 2014).

Brazil introduced universal RVA vaccination in 2006, which significantly reduced the prevalence of RVA infection in children with AGE (Carvalho-Cos-

ta et al. 2011). Although effective in the prevention of RVA infection, the vaccine does not prevent infection due to other viral or bacterial agents. Furthermore, the RVA vaccine elicits greater protection from infection by Wa-like RVA strains than infection by other strains. Enhanced AGE surveillance is required to identify viral aetiological agents that are less frequently reported, especially with respect to AGE outbreaks. Recent evidence from laboratory - and hospital-based viral AGE surveillance has shown an increased prevalence of NoV, HAsTV and HAdV (Ferreira et al. 2012, de Andrade et al. 2014).

In this study, we characterised the viral agents associated with an outbreak of AGE that occurred in Rio de Janeiro, Brazil.

In March of 2013, the Surveillance Epidemiology System was informed of an AGE outbreak that affected 19 individuals in a low-income community in the Bangu neighbourhood of the municipality of Rio de Janeiro, in the state of Rio de Janeiro, Brazil. The outbreak was isolated, affecting people living in close proximity, and lasted less than 10 days. Ten faecal samples were collected from nine patients (six male and three female) who were receiving health care in a local public medical centre (Table). Health authorities from Rio de Janeiro collected single faecal samples on the third or fourth day following the onset of symptoms, except for one patient, from whom two samples were collected. The faecal samples were then sent to the Rotavirus Regional Reference Laboratory/Laboratory of Comparative and Environmental Virology (LRRR/LVCA), FIOCRUZ, for analysis for enteric viruses. All samples were negative for bacterial and protozoal agents, as determined previously

doi: 10.1590/0074-02760160030

+ Corresponding author: guaratiba@ioc.fiocruz.br

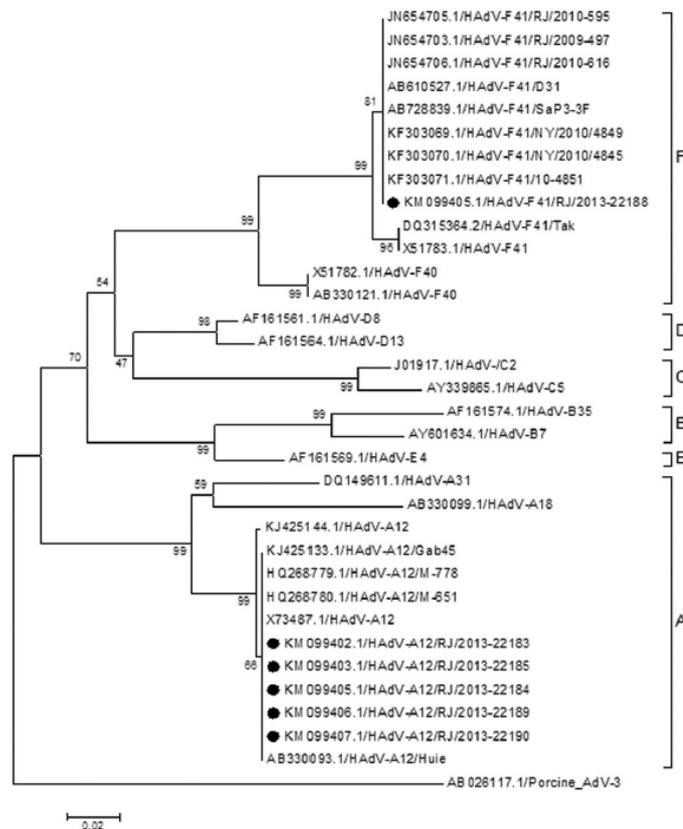
Received 29 January 2016

Accepted 9 April 2016

TABLE  
Epidemiological and clinical characteristics of the patients analysed for the presence of enteric viruses associated with a gastroenteritis outbreak in Rio de Janeiro, Brazil, 2013

Patient	Age	Gender	Symptoms	Days of diarrhea	PCR for HAdV <sup>b</sup>	Type	qPCR HAdV (Virus concentration) <sup>c</sup>
1 <sup>a</sup>	6 months	Male	Fever/diarrhea	03/04	HAdV	A12	2.2 X 10 <sup>7</sup> / 2.8 X 10 <sup>7</sup>
2	8 months	Male	Fever/diarrhea	04	HAdV	A12	1.1 X 10 <sup>7</sup>
3	18 months	Male	Diarrhea	03	HAdV	F41	1.4 X 10 <sup>3</sup>
4	22 months	Male	Fever/diarrhea	04	HAdV	A12	4.2 X 10 <sup>6</sup>
5	23 months	Female	Diarrhea	03	ND	ND	ND
6	25 months	Female	Fever/vomit/diarrhea	03	HAdV	A12	3.2 X 10 <sup>7</sup>
7	30 months	Male	Fever/diarrhea	04	ND	ND	ND
8	31 years	Male	Diarrhea	03	ND	ND	ND
9	53 years	Female	Diarrhea	04	ND	ND	ND

<sup>a</sup>patient 1: two samples were collected on different days; <sup>b</sup>all samples were tested for rotavirus (RVA), norovirus (NoV), human adenovirus (HAdV), human astrovirus (HAstV), human bocavirus (HBov) and Aichi virus (AiV); <sup>c</sup>DNA copies/g stool, PCR = qPCR+; ND = not detected.



Phylogenetic analysis of human adenovirus based on a partial nucleotide sequence (301 bp) of the Hexon region of the structural gene. Neighbour-joining dendrograms were constructed with the MEGA 5 program. The studied samples are indicated, as well as the GenBank accession numbers and countries of origin. Bootstrap values are above 70%, as estimated with 1,000 pseudoreplicate data sets at each node.

by the Central Public Health Laboratory (LACEN). This study is part of a larger project, which was approved by the Ethical Research Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) (311/2006), with the primary goal of identifying the aetiological agents of viral AGE outbreaks that were referred to the reference centre for analysis. RVA infection was determined by enzyme immunoassay [EIA, Premier Rotaclone®, Meridian Bioscience, Inc. (Cincinnati, Ohio, USA); Ridascreen®, R-Biopharm (Darmstadt, Hesse, Germany)] according to the manufacturer's protocol. For all other viruses, viral nucleic acids were extracted from 10% (v/v) faecal suspensions in Tris-Ca<sup>2+</sup> buffer (pH 7.2), using the QIAmp® viral RNA Mini kit (QIAGEN®, Valencia, CA, USA). Extracted nucleic acids were analysed for the presence of NoV, HAsV, HAdV, HBoV and AiV using conventional and qualitative polymerase chain reaction (PCR), as described previously (Yamashita et al. 2000, Allard et al. 2001, Kapoor et al. 2010, Ferreira et al. 2012). Quantitative PCR (TaqMan® real-time PCR, qPCR) targeting the conserved region of the HAdV hexon (Hernroth et al. 2002) was also performed. HAdV PCR amplicons (301 bp) were purified using the QIAmp® PCR Purification Kit (QIAGEN, CA, USA) and then subjected to sequencing. Both strands of DNA in PCR amplicons were sequenced using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystem, CA, USA). Centri-Sep columns (Princeton Separations, CA, USA) were used to purify sequencing reaction products prior to analysis in the genetic analyser. A neighbour-joining phylogenetic tree was constructed from the sequences using MEGA 5 software; 1,000 pseudo replicate data sets were used to achieve a Bootstrap value above 70%. The nucleotide sequences reported in this study are listed in the GenBank database under the accession numbers KM099402 - KM099407. Although non-enteric HAdVs are not routinely screened by RRRL-LVCA, nucleotide sequence analysis can be used to identify these viruses in stool samples from patients with diarrhoea.

All 10 faecal samples were negative for RVA, NoV, HAsV, AiV and HBoV. Six (60%) faecal samples from five patients (including two samples from patient 1) were positive for HAdV by PCR. HAdV-positive individuals (four male and one female) ranged in age from six-25 months (mean age 16 months). Clinical symptoms included fever (4/5), diarrhoea (5/5), and vomiting (1/5). No viruses were detected in any of the adult patients or in one child, in whom diarrhoea was the sole clinical manifestation, as presented in the Table. Unfortunately, no information about the children's RVA vaccination status was available.

Viral loads of HAdV A12-positive samples, as determined by qPCR, ranged from  $4.2 \times 10^6$  to  $3.2 \times 10^7$  DNA copies/g stool (mean  $1.9 \times 10^7$ ). HAdV A12-positive samples had greater viral loads than F41 ( $1.4 \times 10^3$  DNA copies/g stool) (Table).

HAdV sequences were subjected to genetic characterisation, as well as relationship assessment determined by comparisons of nucleotide sequences both among the sequences obtained in this study and the available reference strains in the GenBank database. Five of the six

HAdV-positive samples were characterised as non-enteric HAdV A12, with 100% nucleotide identity among these sequences and others from Japan (AB330093.1), India (HQ268779.1 and HQ268780.1) and Gabon (KJ425133.1).

One sequence was characterised as enteric HAdV F41, which is highly similar (98.6% to 100% nucleotide identity) to strains from Japan (AB728839.1), Brazil (JN654703.1, JN654705.1 and JN654706.1) and the USA (KF303069.1, KF303070.1 and KF303071.1) (Figure).

HAdVs were the sole aetiological agents detected in an AGE outbreak in a low-income community in Rio de Janeiro. The non-enteric HAdV A12 was for the first time associated with an AGE outbreak in Brazil. Detection of this type of adenovirus has been reported previously in children with diarrhoea (Ren et al. 2013, Lekana-Douki et al. 2015), including cases of outbreaks (Chitambar et al. 2012), but HAdV 12 has not been associated with AGE until now. The viral loads of the HAdV 12-positive individuals in this study suggest viral replication in the gut. Furthermore, high HAdV viral loads are associated with the high transmissibility of adenoviral diseases. A previous report implicated HAdV A12 as the aetiological agent of AGE outbreaks (Akihara et al. 2005).

Other than RVA, adenoviruses are considered the most important causative agents of gastroenteritis in children under 5 years of age (Elhag et al. 2013), especially enteric HAdV F40/41 (Haupt E, Personal Communication). Enteric HAdV F41 was detected in only one child in this study, who presented a low viral load, possibly due to a previous infection with HAdV F41 because prolonged shedding after HAdV infection has been reported (Akihara et al. 2005).

HAdV A12 Brazilian strains showed homology (100%) with strains obtained from patients with keratoconjunctivitis in Japan and from patients with AGE in India and Gabon (Ishiko et al. 2008, Chitambar et al. 2012, Lekana-Douki et al. 2015). Such shared homology suggests that this strain was imported recently to Brazil. The main symptoms observed in this outbreak were diarrhoea and fever; the child with a higher viral load exhibited more severe disease associated with vomiting. HAdV is associated with moderate to severe AGE, of which the predominant symptoms include diarrhoea, fever, vomiting and abdominal pain (Corcoran et al. 2014).

In conclusion, this study emphasises the importance of identifying unique or rare aetiological agents associated with AGE. Studies focusing on the prevalence of distinct AGE agents are especially relevant in countries where RVA vaccination is routinely performed, such as Brazil.

#### REFERENCES

- Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Hansman G, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a day care center in Japan. *Arch Virol*. 2005; 150(10): 2061-75.
- Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(2): 498-505.
- Carvalho-Costa FA, Volotão EM, de Assis RM, Fialho AM, de Andrade JS, Rocha LN, et al. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. *Pediatr Infect Dis J*. 2011; 30(Suppl. 1): S35-41.

- Chitambar S, Gopalkrishna V, Chhabra P, Patil P, Verma H, Lahon A, et al. Diversity in the enteric viruses detected in outbreaks of gastroenteritis from Mumbai, Western India. *Int J Environ Res Public Health*. 2012; 9(3): 895-915.
- Corcoran MS, van Well GT, van Loo IH. Diagnosis of viral gastroenteritis in children: interpretation of real-time PCR results and relation to clinical symptoms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33(10): 1663-73.
- de Andrade JS, Rocha MS, Carvalho-Costa FA, Fioretti JM, Xavier MP, Nunes ZM, et al. Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. *J Clin Virol*. 2014; 61(3): 345-52.
- Elhag WI, Saeed HA, Omer EFE, Ali AS. Prevalence of rotavirus and adenovirus associated with diarrhea among displaced communities in Khartoum, Sudan. *BMC Infect Dis*. 2013; 13: 209.
- Ferreira MS, Xavier MP, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM, et al. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio de Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). *PLoS ONE*. 2012; 7(3): e33754.
- Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(9): 4523-33.
- Ishiko H, Shimada Y, Konno T, Hayashi A, Ohguchi T, Tagawa Y, et al. Novel human adenovirus causing nosocomial epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(6): 2002-8.
- Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis*. 2010; 201(11): 1633-43.
- Lee JI, Lee GC, Chung JY, Han TH, Lee YK, Kim MS, et al. Detection and molecular characterization of adenoviruses in Korean children hospitalized with acute gastroenteritis. *Microbiol Immunol*. 2012; 56(8): 523-8.
- Lekana-Douki SE, Kombila-Koumavor C, Nkoghe D, Drosten C, Drexler JF, Leroy EM. Molecular epidemiology of enteric viruses and genotyping of rotavirus A, adenovirus and astrovirus among-children under 5 years old in Gabon. *Int J Infect Dis*. 2015; 34: 90-5.
- Moyo SJ, Hanevik K, Blomberg B, Kommedal O, Nordbo SA, Mabelle S, et al. Prevalence and molecular characterisation of human adenovirus in diarrhoeic children in Tanzania; a case control study. *BMC Infect Dis*. 2014; 14: 666.
- Portes SA, Volotão EM, Rose TL, Rocha MS, Xavier MPTP, de Assis RM, et al. Aichi virus positivity in HIV-1 seropositive children hospitalized with diarrheal disease. *Curr HIV Res*. 2015; 13(4): 325-31.
- Ren Z, Kong Y, Wang J, Wang Q, Huang A, Xu H. Etiological study of enteric viruses and the genetic diversity of norovirus, sapovirus, adenovirus, and astrovirus in children with diarrhea in Chongqing, China. *BMC Infect Dis*. 2013; 13: 412.
- Yamashita T, Sugiyama M, Tsuzuki H, Sakae K, Suzuki Y, Miyazaki Y. Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the Picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(8): 2955-61.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Frequência de detecção de AiV-1 em crianças HIV-1 soropositivas e HIV-1 soronegativas hospitalizadas com DD (Artigo 4.1)

O presente trabalho identificou uma taxa de detecção de AiV-1 superior em crianças HIV-1 soropositivas quando comparadas as crianças HIV-1 soronegativas. Alta taxa de detecção deste vírus também foi demonstrada entre adultos HIV-1 soropositivos com DD (Oude *et al.*, 2014). Em relação as crianças HIV-1 soronegativas, a baixa taxa de detecção deste vírus foi similar aos resultados previamente descritos em indivíduos imunocompetentes (Sdiri-Loulizi *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Kaikkonen *et al.*, 2010; Drexler *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2011).

A excreção crônica do AiV-1 foi demonstrada entre as crianças HIV-1 soropositivas com AIDS, enquanto que entre as crianças soronegativas esta complicação não foi observada. As crianças HIV-1 soropositivas infectadas pelo AiV-1 estavam gravemente imunocomprometidas mesmo sob tratamento com HAART. Não podemos afirmar que o AiV-1 tenha sido efetivamente o agente etiológico responsável pelo quadro de DD estudados, mas este vírus infectou mais frequentemente as crianças imunocomprometidas com AIDS, quando comparadas com as crianças HIV-1 soronegativas, sugerindo que o AiV-1 pode ser um patógeno oportunista.

Foi observado que o AiV-1 entre as crianças com HIV-1/AIDS foi mais frequentemente detectado em associação com outros vírus gastroentéricos, como RVA, NoV, HAstV e HAdV, enquanto que na criança HIV-1 soronegativa, o AiV-1 foi codetectada com RVA. Os resultados deste estudo, corroboram as observações de que AiV-1 é frequentemente encontrado em infecções mistas (Yang *et al.*, 2009; Jonsson *et al.*, 2012).

Neste estudo foi demonstrada a circulação do AiV-1 genótipo A e foi confirmada a presença do genótipo B entre as crianças estudadas (HIV-1 soropositivas e soronegativas). O genótipo A foi mais detectado entre as crianças HIV-1 soropositivas e o genótipo B foi detectado em uma criança HIV-1 soropositiva. Este é o primeiro trabalho que mostra a circulação destes genótipos em crianças HIV-1 soropositivas e o primeiro relato do genótipo A nas Américas. Estudos prévios demonstraram a

circulação do genótipo A entre os pacientes imunocompetentes na Europa (Kaikkonen *et al.*, 2010; Drexler *et al.*, 2011), Ásia (Yang *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2011) e África (Sdiri-Loulizi *et al.*, 2009). Considerando os pacientes HIV-1 soropositivos, um único estudo demonstrou a detecção do AiV-1 em adultos, mas a caracterização dos genótipos não foi apresentada naquela população (Oude *et al.*, 2014).

Os AiV-1 pertencentes ao genótipo A, aqui descritos, foram geneticamente relacionados aos AiV-1 genótipo A que circularam no Japão (Yamashita *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 2007) e Alemanha (Drexler *et al.*, 2011), enquanto que o AiV-1 genótipo B foi mais relacionado aos que circularam no Paquistão e Indonésia (Yamashita *et al.*, 2000) do que no Brasil (Oh *et al.*, 2006).

## **5.2 Frequência de detecção de RVA, NoV, HAstV, HAdV e HBoV em crianças HIV-1 soropositivas e HIV-1 soronegativas hospitalizadas com DD (Artigo 4.2)**

Neste estudo, foi demonstrada a detecção do RVA, NoV, HAstV, HAdV e HBoV entre as crianças estudadas. Foi possível demonstrar uma alta taxa na detecção de pelo menos um vírus entérico e emergente (74%) nas crianças HIV-1 soropositivas. Contrariamente ao observado neste trabalho, a literatura tem demonstrado esta detecção variando de 6,4% a 52%, nos Estados Unidos e América do Sul (Grohmann *et al.*, 1993; González *et al.*, 1998; Giordano *et al.*, 1999; Liste *et al.*, 2000).

Entre as crianças HIV-1 soronegativas, hospitalizadas com DD, a detecção foi menor (64%) do que entre as crianças HIV-1 soropositivas. As taxas de detecção dos NoV, HAdV, HBoV foram significativamente maiores entre as crianças HIV-1 soropositivas, enquanto que os RVA e HAstV foram mais frequentes entre as crianças soronegativas.

Os vírus gastroentéricos são frequentemente detectados em infecções mistas. O HBoV tem sido detectado em infecções mistas, apresentando altas taxas de coinfeções entre crianças soronegativas, hospitalizadas com DD (Zhang *et al.*, 2015). Neste estudo, os vírus estudados foram detectados como infecções únicas, duplas e triplas, sendo as infecções triplas mais detectadas entre as crianças HIV-1 soropositivas. Estes resultados sugerem que as crianças estudadas foram altamente expostas a múltiplos vírus gastroentéricos. Coinfeções com NoV, RVA e HAdV também foram observadas em crianças com HIV-1 no Quênia (Mans *et al.*, 2014).

### 5.2.1 Rotavírus

Considerando-se os grupos etários, o RVA foi mais frequentemente detectado em casos envolvendo crianças de 0-24 meses de idade, tanto nas crianças HIV-1 soropositivas quanto nas soronegativas. Este resultado corrobora o observado na literatura (Moyo *et al.*, 2014a). Independente da faixa etária, a detecção do RVA foi significativamente menor entre as crianças HIV-1 soropositivas do que entre as soronegativas ( $p < 0,001$ ), sugerindo uma menor importância deste vírus nas crianças com HIV-1. Este estudo, constitui o primeiro relato da detecção do RVA em crianças HIV-1 soropositivas no Brasil. Nos poucos estudos brasileiros, visando investigar a presença do RVA em pacientes HIV-1 soropositivos, o RVA não foi detectado entre as crianças HIV-1 soropositivas (Rossit *et al.*, 2007). Outros estudos, também apresentaram frequências iguais ou inferiores, quando comparadas às frequências entre as crianças HIV-1 soronegativas (Pavia *et al.*, 1992; Oshitani *et al.*, 1994; Guarino *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 1998; Cunliffe *et al.*, 2001; Moyo *et al.*, 2014a).

A diversidade genética dos RVA tem sido descrita entre as crianças com DD, no mundo inteiro. No presente estudo, foi detectada a alta diversidade genética dos RVA, com circulação de quatro genótipos G e dois P, entre as crianças HIV-1 soropositivas, e seis genótipos G e dois P, entre as crianças soronegativas, mostrando distribuição similar destes genótipos e predomínio das combinações G1P[8] e G9P[8], entre as crianças estudadas. Este é o primeiro relato que mostra a diversidade genética do RVA entre crianças HIV-1 soropositivas, no Brasil. Em um estudo anterior, realizado em São Paulo, com adultos portadores de HIV-1, o único genótipo detectado foi o G4P[8] (Morillo *et al.*, 2010). A alta diversidade do RVA já havia sido descrita em crianças HIV-1 soropositivas no Quênia, mostrando circulação de cinco genótipos G e três P, sendo o G3P[8] a combinação mais prevalente (Kiulia *et al.*, 2009).

### 5.2.2 Norovírus

No presente estudo, demonstramos que a taxa de detecção do NoV foi significativamente maior nas crianças HIV-1 soropositivas. Nosso estudo, reporta pela primeira vez a detecção do NoV entre as crianças HIV-1 soropositivas. No Brasil, o NoV foi associado à DD em adultos HIV-1 soropositivos (Gonçalves *et al.*, 2009). Em

estudo prévio, na Venezuela, este vírus também foi mais frequente entre as crianças soropositivas (51%) do que entre as soronegativas (24%) (Rodriguez-Guillén *et al.*, 2005). O caráter oportunista do NoV foi evidenciado, uma vez que, entre as crianças HIV-1 soropositivas, a taxa de detecção deste vírus foi 3 vezes maior nas crianças com contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup><200 células/mm<sup>3</sup>. Apesar das cargas virais do NoV terem sido maiores entre as crianças HIV-1 soropositivas, e particularmente entre as imunocomprometidas, as diferenças não foram estatisticamente significativas.

Neste estudo, o NoV GII foi o mais detectado, com predominância do GII.4 e GII.12 entre as crianças HIV-1 soropositivas e GII.4 entre as soronegativas. Na Tanzânia, o NoV GII também foi o mais detectado entre as crianças HIV-1 soropositivas, hospitalizadas com DD (Moyo *et al.*, 2014). No Quênia, detectaram GII.12 nas crianças HIV-1 soropositivas, porém GII.2 e GII.4 foram os mais frequentes entre estas crianças (Mans *et al.*, 2014).

O NoV GII é o genogrupo mais detectado mundialmente, com o genótipo GII.4 mais prevalente na DD em indivíduos soronegativos, inclusive no Brasil (Ferreira *et al.*, 2012; Fioretti *et al.*, 2011, 2014; Aragão *et al.*, 2013; Fumian *et al.*, 2013; Siqueira *et al.*, 2013; de Andrade *et al.*, 2014; Amaral *et al.*, 2015; Sá *et al.*, 2015; Vinjé, 2015; Portal *et al.*, 2016; Dábilla *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017). O GII.12 também foi detectado em crianças HIV-1 soronegativas, hospitalizadas com DD, no Brasil (Portal *et al.*, 2016).

Variantes do GII.4, Den Haag\_2006b e US95\_96 foram detectadas entre as crianças HIV-1 soropositivas, enquanto que, entre as soronegativas foram Kaiso\_2003, Asia\_2003 and Den Haag\_2006b. A circulação de NoV recombinante têm sido observada, quando a caracterização combinada de ambas as regiões da polimerase e do capsídeo são utilizadas (Kronemann *et al.*, 2013; Vinjé, 2015; Fumian *et al.*, 2016). Usando ambas as regiões, caracterizamos as cepas recombinantes, GII.Pa-GII.3, GII.P12-GII10 e GII.P7-GII.6 entre as crianças HIV-1 soropositivas, sendo esta última a mais detectada. Estes resultados, são os primeiros descritos em crianças HIV-1 soropositivas no Brasil.

Nossos resultados confirmaram a detecção de diferentes genótipos nas crianças estudadas, demonstrando a alta diversidade genética entre as crianças HIV-1 soropositivas. Este é o primeiro relato mostrando a diversidade genética do NoV em crianças HIV-1 soropositivas. Esta alta diversidade já havia sido descrita para os

indivíduos HIV-1 soronegativos, no Brasil (Fumian *et al.*, 2016). Nossos dados reafirmam que o NoV é um importante agente etiológico de DD em crianças HIV-1 soropositivas. A importância do NoV, como causa de hospitalização e óbitos associados à DD em crianças soropositivas para HIV-1, também foi demonstrada na África do Sul (Page *et al.*, 2017).

### 5.2.3 *Astrovírus humano*

Nosso estudo, mostrou que o HAstV, semelhante ao RVA, foi mais frequente entre as crianças soronegativas. Apesar disso, a carga viral do HAstV foi significativamente maior entre as crianças HIV-1 soropositivas, independente da contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, sugerindo uma eficiente replicação do HAstV no trato gastrointestinal destas crianças. Este estudo, relata pela primeira vez a detecção do HAstV entre crianças HIV-1 soropositivas. Além disso, este vírus apresentou alta taxa de detecção associada com os outros vírus gastroentéricos estudados, tanto entre as crianças HIV-1 soropositivas (72%) quanto nas crianças soronegativas (62%). O HAstV foi o terceiro vírus gastroentérico mais detectado entre as crianças HIV-1 soronegativas, porém em nosso estudo, a importância deste vírus como agente de DD em crianças HIV-1 soropositivas não foi estabelecida. Na Argentina, o HAstV foi detectado em pacientes HIV soropositivos, mas não foi significativamente associado à DD (Giordano *et al.*, 1999).

O HAstV 1 foi o mais frequente entre as crianças estudadas, sendo o único detectado entre as crianças HIV-1 soropositivas. Este é o primeiro relato da detecção do HAstV 1 entre crianças HIV-1 soropositivas. Entre as crianças soronegativas, o HAstV 2 foi o segundo mais detectado, seguido pelo HAstV 3. Nosso resultado reforça os obtidos em outros estudos de várias regiões do mundo, incluindo o Brasil que relatou a predominância de HAstV-1, em crianças soronegativas (Mustafa *et al.*, 2000; Cunliffe *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Marshall *et al.*, 2007; Gabbay *et al.*, 2007a; Victoria *et al.*, 2007a; Guo *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2012; Afrad *et al.*, 2013; Bosch *et al.*, 2014; Xavier *et al.*, 2015).

#### 5.2.4 Adenovírus humano

Episódios de diarreia são uma das principais complicações no decurso de infecção por HIV-1. A diarreia em pacientes com AIDS está associada com perda de peso, desnutrição e comprometimento progressivo do estado geral de saúde, contribuindo para caquexia e morte, especialmente na era pré-HAART.

Este estudo demonstrou maior frequência do HAdV entre as crianças HIV-1 soropositivas, sendo o vírus mais detectado entre estas crianças (30,5%) e o segundo mais detectado entre as soronegativas (14,4%). Nosso estudo, reporta pela primeira vez a detecção do HAdV em crianças HIV-1 soropositivas. Estudos anteriores, no Brasil, mostraram a detecção do HAdV variando de 2% a 16% entre as crianças soronegativas (Magalhães *et al.*, 2007; Andreasi *et al.*, 2008; Amaral *et al.*, 2015). Outros países, mostraram a detecção deste vírus variando de 3,8% a 31,2% (Carraturo *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2009; Quédraogo *et al.*, 2016), sendo o segundo mais prevalente entre as crianças imunocompetentes (Quédraogo *et al.*, 2016) e, entre pacientes HIV-1 soropositivos, o HAdV tem sido demonstrado com frequências variando entre 0%-50% (Grohmann *et al.*, 1993; Durepaire *et al.*, 1995; González *et al.*, 1998; Giordano *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999; Liste *et al.*, 2000; Treviño *et al.*, 2001; Curlin *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010; Morillo *et al.*, 2010; Moyo *et al.*, 2014c).

Analisando os grupos etários, nós observamos que o HAdV foi mais detectado entre as crianças HIV-1 soropositivas de 25-60 meses, enquanto que nas crianças HIV-1 soronegativas este vírus foi mais detectado entre as crianças menores de 24 meses de idade. Um estudo prévio no Brasil, com crianças imunocompetentes, demonstrou que 79% dos casos positivos para HAdV ocorreram entre as crianças menores de dois anos de idade (Filho *et al.*, 2007).

Em pacientes soropositivos para HIV-1, a diarreia é frequentemente causada por agentes oportunistas, como microsporidia e *Cryptosporidium* sp (Agholi *et al.*, 2013), bem como CMV e outros agentes como o vírus *Herpes simplex*, *Histoplasma capsulatum* e *Mycobacterium avium-intracellulare*. Em pacientes imunocomprometidos, outras infecções, especialmente CMV, podem coexistir com HAdV.

Além da importante frequência do HAdV entre as crianças HIV-1 soropositivas observada em nosso estudo, foi demonstrada também a detecção deste vírus em

26,5% das crianças imunocomprometidas, confirmando o comportamento oportunista deste vírus. Um estudo prévio, no Brasil, mostrou o HAdV como o vírus mais detectado (21,9%) entre adultos HIV-1 soropositivos, com (14,4%) e sem DD (7,5%), porém não foi observado neste estudo o carácter oportunista do HAdV (Morillo *et al.*, 2010).

Pela primeira vez no Brasil, relatamos o HAdV entérico (HAdV-F40 e –F41) em crianças HIV-1 soropositivas, sendo o HAdV-F40 o mais detectado (49,2%) nestas crianças. Outros estudos, mostraram que o HAdV-F é um importante patógeno em adultos HIV-1 soropositivos (Dionisio *et al.*, 1997; Giordano *et al.*, 1999).

Neste estudo, o HAdV-F40 também foi o vírus mais detectado entre as crianças soronegativas (38,9%), enquanto que o HAdV-F41 foi menos detectado nos dois grupos estudados. Este resultado foi similar ao obtido em um estudo prévio no Brasil, que detectou os HAdV-F40/41 em 65% das amostras positivas para HAdV, sendo que o HAdV-F40 foi o mais prevalente, apresentando um percentual de 62% (Filho *et al.*, 2007). Porém, ele difere dos dados obtidos recentemente na literatura, inclusive no Brasil, que reporta o HAdV-F41 como o mais prevalente entre as crianças imunocompetentes (Quédraogo *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2016).

Observamos também uma grande diversidade de HAdVs entre as crianças estudadas, com detecção de vírus não associados de forma exclusiva com DD, porém as cargas virais nas fezes foram semelhantes tanto para os HAdV entérico como para os não entéricos, sugerindo que pode existir comparável intensidade de replicação no trato gastrointestinal.

Neste estudo, o HAdV-D foi o segundo vírus mais frequente entre os HAdV detectados nas crianças HIV-1 soropositivas. Muitos sorotipos de HAdV, que infectam o trato gastrointestinal de pacientes com HIV, pertencem a esta espécie (Khoo *et al.*, 1995), sendo este vírus o mais detectado em crianças HIV-1 soropositivas com DD (Magwalivha *et al.*, 2010).

Entre as crianças HIV-1 soropositivas, o HAdV foi detectado com frequência e carga viral semelhantes entre os pacientes com contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> abaixo e acima de 200 células/mm<sup>3</sup>, mostrando a importância deste vírus para o paciente HIV-1 soropositivo com DD, imunocomprometido ou não.

### 5.2.5 Bocavírus humano

O presente estudo mostrou que HBoV é excretado com mais frequência em crianças HIV-1 soropositivas do que em crianças HIV-1 soronegativas, sendo o terceiro vírus mais detectado entre as crianças HIV-1 soropositivas. Apesar da carga viral do HBoV ser alta nos dois grupos estudados, a mediana da carga viral deste vírus, nas fezes, não foi estatisticamente significativa entre as crianças HIV-1 soropositivas, quando comparadas as crianças soronegativas. Este resultado mostra intensa replicação deste vírus no trato gastrointestinal das crianças estudadas, que associada ao sintoma clínico, diarreia, pode sugerir a associação do vírus a DD. Curiosamente, entre as crianças HIV-1 soropositivas o HBoV, como NoV, foi significativamente mais frequente no grupo com contagens de linfócitos TCD4<sup>+</sup><200 células/mm<sup>3</sup>, sugerindo ser importante a detecção deste vírus em pacientes imunocomprometidos.

A detecção do HBoV nas crianças soronegativas (7,2%), hospitalizadas com DD, está em consenso com outros relatos em todo o mundo, mostrando a prevalência de HBoV em 0,8%-20% nesta população (Albuquerque *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Vicente *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008; Alam *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017), enquanto um estudo no Brasil mostrou uma detecção maior (42%) nestas crianças (Campos *et al.*, 2016). Nosso estudo demonstrou similar detecção do HBoV nas diferentes faixas etárias dos dois grupos estudados, este achado contrapõe aos relatos da literatura que tem demonstrado maior frequência do HBoV em crianças ≤ 2 anos de idade (Lee *et al.*, 2007; Alam *et al.*, 2015; Lasure & Gopalkrishina, 2017; Zhou *et al.*, 2017).

Na busca ativa de identificar a ocorrência de mais de um vírus gastroentérico no mesmo espécime clínico, observamos que o HBoV apresentou alta taxa de codetecção com outros vírus gastroentéricos, entre as crianças HIV-1 soropositivas e soronegativas. Este resultado, corrobora os descritos na literatura, incluindo no Brasil, onde a ocorrência do HBoV em coinfeção nos casos de DD tem sido maior que as monoinfecções (Albuquerque *et al.*, 2007; Mitui *et al.*, 2014; Alam *et al.*, 2015; Guido *et al.*, 2016, Zhou *et al.*, 2017). Os dados indicam que HBoV pode existir nos tratos gastrointestinais ou respiratórios como um espectador sem qualquer relação com a doença clínica (Jartti *et al.*, 2012).

Neste estudo, a detecção ocorreu principalmente com os HBoV1, nos dois grupos estudados (resultado não mostrado), resultado similar foi descrito na literatura para crianças soronegativas, hospitalizadas com DD (Lasure & Gopalkrishina, 2017), o que pode nos levar a não considerar o HBoV1 como o agente etiológico principal da infecção. Apesar disso, o HBoV1, um genótipo geralmente detectado em pacientes com infecções respiratórias, foi o mais frequente nos dois grupos estudados, sendo a primeira vez reportado entre as crianças HIV-1 soropositivas. O HBoV pode persistir por muito tempo após a infecção primária (Koskenvuo *et al.*, 2008) e este resultado sugere que, semelhante ao HAdV, o HBoV pode estar envolvido com infecções entéricas persistentes após resolução de infecções do trato respiratório superior em crianças imunocompetentes ou imunodeficientes.

O HBoV 2, foi o segundo genótipo mais detectado entre as crianças HIV-1 soropositivas (28,6%), sendo detectado como infecção única em 75% destas crianças e alta carga viral (mediana da carga viral 5.15 [IQR = 4.5-7.4] log<sub>10</sub> copies/g) (resultado não demonstrado), sugerindo associação deste genótipo à DD, nestas crianças. Estudos anteriores, demonstraram que o HBoV2 raramente ocorre em secreções respiratórias, porém é frequentemente detectado nas fezes de crianças e adultos com sintomas gastrointestinais (Arthur *et al.*, 2009; Chow *et al.*, 2010; Paloniemi *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014), e forneceram evidências para a associação dos HBoV2 à DD (Arthur *et al.*, 2009; Chow *et al.*, 2010). Os HBoV 3 (10,7%) e 4 (3,6%) foram menos detectados entre as crianças HIV-1 soropositivas, enquanto que, os HBoV2 e 3 apresentaram prevalência similar nas crianças soronegativas (11,1%) e o HBoV4 não foi detectado.

Este estudo, mostra a detecção do HBoV4 em crianças HIV-1 soropositivas, hospitalizadas com DD, pela primeira vez no Brasil. Este resultado agregado ao obtido em um estudo anterior, que detectou este vírus em crianças sem sintomas respiratórios e diarreicos (Sousa *et al.*, 2017), confirmam a circulação deste vírus no país. Porém, estudos adicionais são necessários para caracterizar melhor a detecção deste vírus nas crianças e adultos com DD.

O HBoV é um patógeno emergente, considerado como um potencial agente de DD. Sua importância clínica e epidemiológica como agente de DD ainda não foi totalmente esclarecida. Estudos prévios demonstram que o HBoV foi identificado na secreção respiratória de indivíduos HIV-1 soropositivos e soronegativos apresentando

infecções respiratórias agudas (Garbino *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2014) e nas fezes de pacientes HIV-1 soropositivos, no Brasil (Santos *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010). Estudos adicionais, devem ser realizados para caracterizar mais precisamente o papel do HBoV, inclusive como um agente oportunista em crianças imunocomprometidas.

### **5.3 Avaliação da infecção recorrente por HAdV em crianças hospitalizadas com DD e coinfectadas pelo HIV-1 (Artigo 4.3)**

Este estudo, detectou o HAdV recorrentemente em amostras fecais de crianças com HIV-1 soropositivas, coletadas em intervalos variáveis de tempo, durante hospitalizações prolongadas, demonstrando que o HAdV pode estar associado a diarreia crônica e persistente. Um estudo no Brasil, relatou que o HAdV é excretado por pacientes HIV-1 soropositivos, com e sem diarreia (Morillo *et al.*, 2010). A colite associada a HAdV é uma manifestação clínica caracterizada por diarreia persistente, descrita em pacientes HIV-1 soropositivos na era pré-HAART (Khoo *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1999; Pollock, 2001; Rossit *et al.*, 2009).

Nosso estudo demonstrou que, na maioria das crianças com infecção persistente, os adenovírus entéricos HAdV-F40 e -F41 foram identificados com maior frequência. Estes vírus foram detectados em crianças com contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> <200 células/mm<sup>3</sup> e >200 células/mm<sup>3</sup>, sugerindo a associação destes HAdV à diarreias persistentes em crianças sem e com imunossupressão. Esta última característica, é consistente com relatos de casos descritos na Itália, onde o HAdV-F40 foi detectado em um caso de DD crônica em um adulto com AIDS, durante 13 meses (Dionisio *et al.*, 1997). Na Argentina, o HAdV-F40/41 também foi detectado em adulto HIV soropositivo, com DD crônica (Giordano *et al.*, 1999). O HAdV também é um importante agente patogênico, em crianças que recebem células-tronco e transplante de órgãos sólidos, o que demonstra sua importância em pacientes imunossuprimidos (Hoffman, 2009; Ison & Green, 2009; Hiwarkar *et al.*, 2013; Kosulin *et al.*, 2016).

Aqui também foi observada a detecção de espécies A12, C2, B3, e D, nas crianças HIV-1 soropositivas. Espécies geralmente não associadas à DD são observadas em crianças com diarreia no Brasil e em outros países (Filho *et al.*, 2007; Moyo *et al.*, 2014c). A identificação das espécies B e C, que frequentemente estão

associadas à doença respiratória, pode ser devida a deglutição da secreção respiratória ou devido a infecções persistentes e generalizadas em hospedeiros com sistemas imunológicos deficientes ou comprometidos. Os vírus da espécie C são encontrados nas fezes durante meses e até anos, depois que o vírus não é mais detectado nas secreções respiratórias (Garnett *et al.*, 2002). As infecções entéricas persistentes com adenovírus após a resolução de infecções do trato respiratório superior (sintomáticas ou não), em lactentes e crianças, foram bem documentadas (Fox *et al.*, 1977). Em indivíduos imunossuprimidos as espécies, como B, E, A e D são comuns e os pacientes com HIV parecem ser especialmente suscetíveis a infecções do trato gastrointestinal por adenovírus da espécie D (Hierholzer, 1992).

Estudos recentes demonstraram sítios de infecção latente para HAdV, dos quais pode haver disseminação em casos de imunossupressão (Garnett *et al.*, 2002; Garnett *et al.*, 2009; Kosulin *et al.*, 2016). Isto mostra que, o tecido linfóide do intestino pode manter a infecção por períodos prolongados (Kosulin *et al.*, 2016). Neste estudo foi observado que as cargas virais inicialmente detectadas foram significativamente maiores que as subsequentemente detectadas, sugerindo a ativação de mecanismos imunes no nível intestinal, capazes de reduzir a carga viral no decorso de infecções recorrentes. Curiosamente, não observamos diferenças nas cargas virais de HAdV em crianças com diferentes graus de imunocomprometimento, conforme avaliado pelas contagens de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, exceto para a criança com detecção persistente de HAdV D. A espécie D tem sido associada à DD em pacientes com AIDS (Hierholzer, 1992; De Jong *et al.*, 1999) e alta prevalência deste vírus foi observada em crianças HIV-1 soropositivas com DD, no Quênia (Magwalivha *et al.*, 2010).

O presente estudo aponta para uma investigação mais aprofundada das infecções intestinais por HAdV em crianças com diarreia persistente e crônica associada à infecção por HIV-1. Deve-se considerar que, existem protocolos para o tratamento de infecções HAdV graves e com risco de vida, especialmente em receptores de transplante, sendo Cidofovir o medicamento mais utilizado (Florescu *et al.*, 2012). O uso desta droga deve ser considerado em diarreia persistente em pacientes soropositivos para HIV-1 em que a infecção por HAdV é detectada.

#### **5.4 Papel de HAdV12 como agente etiológico de surto de DD em crianças no RJ (Artigo 4.4)**

Neste estudo, investigamos os agentes virais (RVA, NoV, HAstV, HAdV, HBoV e AiV-1) em um surto de DD, que ocorreu no Rio de Janeiro em 2013. O HAdV foi o único agente etiológico detectado neste surto, sendo o HAdV-A12 (não entérico), pela primeira vez associado à um surto DD no Brasil. As altas cargas virais do HAdV-A12 detectadas nas fezes das crianças deste estudo, sugerem replicação viral no intestino. Estudos anteriores, detectaram o HAdV-A12 em crianças com DD (Ren *et al.*, 2013, Lekana-Douki *et al.*, 2015), inclusive em casos de surtos (Akihara *et al.*, 2005; Chitambar *et al.*, 2012).

Além do RVA, os HAdV são considerados os agentes causais mais importantes da gastroenterite em crianças com menos de 5 anos de idade (Elhag *et al.*, 2013), especialmente HAdV-F40/41 entérico (Haupt E, Comunicação Pessoal). O HAdV-F41 foi detectado em apenas uma criança neste estudo, apresentando baixa carga viral, possivelmente devido a uma infecção prévia, porque a excreção prolongada após a infecção por HAdV foi descrita (Akihara *et al.*, 2005).

Os principais sintomas observados nas crianças acometidas pelo surto foram diarreia e febre. A criança com maior carga viral apresentou doença mais grave associada ao vômito. HAdV está associado a DD moderada a grave, nas quais, os sintomas predominantes incluem diarreia, febre, vômitos e dor abdominal (Corcoran *et al.*, 2014).

As cepas brasileiras de HAdV-A12 apresentaram homologia (100%) com cepas obtidas de pacientes com ceratoconjunctivite no Japão e de pacientes com DD na Índia e Gabão (Ishiko *et al.*, 2008, Chitambar *et al.*, 2012, Lekana-Douki *et al.*, 2015). Essa homologia sugere que essa cepa pode ter sido importada recentemente para o Brasil.

A diarreia infecciosa está entre uma das doenças mais frequentemente observadas entre os pacientes HIV-1 soropositivos e, neste cenário, a doença causada pelos vírus entéricos, que pode ser grave, ocorre principalmente nos primeiros anos de vida. A exposição de crianças portadoras de HIV-1 à infecção natural pelos RVA, NoV, HAdV, HAst, HBoV e AiV ocorre frequentemente e ficou demonstrada neste estudo. Uma vez que, a diarreia pode constituir uma das principais causas de óbitos nesta população, estudos como os apresentados aqui e estudos futuros, encontram uma efetiva aplicação.

## **6 CONCLUSÕES**

- No decorrer dos 14 anos do estudo (1997-2010), foi observada a circulação frequente de vírus gastroentéricos e emergentes no Rio de Janeiro, nos casos de DD em crianças HIV-1 soropositivas e soronegativas.
- A ocorrência de coinfeções demonstram que as crianças estudadas foram frequentemente expostas a múltiplos vírus gastroentéricos e emergentes.
- Os AiV-1, NoV, HBoV e HAdV foram significativamente mais frequentes entre as crianças HIV-1 soropositivas do que nas soronegativas, demonstrando que a infecção por esses vírus é uma realidade nesta população.
- A detecção do RVA foi significativamente menor entre as crianças HIV-1 soropositivas, revelando uma associação negativa destes vírus e a infecção pelo HIV-1.
- Apesar da associação negativa dos HAsVs e a infecção pelo HIV-1, a alta carga viral encontrada nas crianças soropositivas destaca a importância destes como agente de doenças do trato gastrointestinal.
- Foi demonstrado o papel dos NoV, HAdV e AiV-1 como potenciais agentes oportunistas em crianças HIV-1 soropositivas imunocomprometidas e a excreção crônica e persistente de AiV-1 e HAdV foi evidenciada, nestas crianças.
- A detecção do HBoV foi observada de forma importante entre as crianças HIV-1 soropositivas, porém, apenas para o HBoV2 a associação à DD é sugerida.
- A diversidade genética foi demonstrada para os vírus estudados, destacando a importância da vigilância e epidemiologia molecular destes vírus.

- O HAdV A12 (não entérico) foi associado ao surto ocorrido no RJ em 2013 e é o primeiro relato da associação deste vírus a DD em nosso país, enfatizando a importância da vigilância dos vírus emergentes ou menos frequentemente associados a esta doença.
- Os vírus gastroentéricos usualmente detectados e os emergentes devem ser considerados uma causa importante de DD entre as crianças HIV-1 soropositivas, para o manejo e estabelecimento de abordagens terapêuticas neste pacientes, além da vigilância destes agentes ser especialmente relevante em países onde a vacinação contra o RVA é rotineiramente realizada, como no caso do Brasil.

## **7 PERSPECTIVAS**

Manter a linha de pesquisa em adenovírus e novos vírus, contribuindo para a vigilância epidemiológica das viroses associadas aos casos de DD, com contínua

investigação dos HAdV, HBoV, AiV-1 e outros vírus emergentes. Estabelecer e desenvolver protocolos para avaliar o papel dos vírus emergentes nas DD em crianças e adultos.

## **8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Adams MJ, King AMQ, Carstens EB. 2013. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 158.

- Afrad MH, Matthijnssens J, Moni S, Kabir F, Ashrafi A, Rahman MZ, *et al.* 2013. Genetic characterization of a rare bovine-like human VP4 mono-reassortant G6P[8] rotavirus strain detected from an infant in Bangladesh. *Infect Genet Evol* 19:120-6.
- Agholi M, Hatam GR, Motazedian MH. 2013. HIV/AIDS-associated opportunistic protozoal diarrhea. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29(1):35-41.
- Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Hansman G, Okitsu S, Ushijima H. 2005. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a day care center in Japan. *Arch Virol* 150(10):2061-75.
- Al Anazi AR. 2009. Gastrointestinal opportunistic infections in human immunodeficiency virus disease. *Saudi J Gastroenterol* 15(2):95-9.
- Alam MM, Khurshid A, Shaukat S, Sharif S, Suleman RM, Angez M, *et al.* 2015. Human bocavirus in Pakistani children with gastroenteritis. *J Med Virol* 87:656-663.
- Albrecht H, Stellbrink HJ, Fenske S, Ermer M, Raedler A, Greten H. 1993. Rotavirus antigen detection in patients with HIV infection and diarrhea. *Scand J Gastroenter* 28(4):307-10.
- Albuquerque MCM, Rocha LN, Benati FJ, Soares CC, Maranhão AG, Ramirez ML, *et al.* 2007. Human Bocavirus Infection in Children with Gastroenterites, Brazil. *Emerg Infect Dis* 13(11):1756-1758.
- Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:12891-12896.
- Amaral MS, Estevam GK, Penatti M, Lafontaine R, Lima IC, Spada PK *et al.* 2015. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, western Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110(2):215-21.

Ambert-Balay K, Lorrot M, Bon F, Giraudon H, Kaplon J, Wolfer M, *et al.* 2008. Prevalence and genetic diversity of Aichi virus strains in stool samples from community and hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 46(4):1252-1258.

Andrade JA, Moreira C, Fagundes Neto U. 2000. [Persistent diarrhea]. *J Pediatr* 76 Suppl 1:S119-26.

Andreas MS, Cardoso DD, Fernandes SM, Tozetti IA, Borges AM, Fiaccadori FS, *et al.* 2008. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(7):741-43.

Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, de Lucena MS, Siqueira JA, Fumian TM, *et al.* 2013. Norovirus diversity in diarrheic children from an African-descendant settlement in Belém, Northern Brazil. *PLoS One* 8(2):e56608.

Arana A, Cilla G, Montes M, Gomariz M, Pérez-Trallero E. 2014. Genotypes, recombinant forms, and variants of norovirus GII.4 in Gipuzkoa (Basque Country, Spain), 2009-2012. *PLoS One* 3;9(6):e98875.

Archin N M, Sung JM, Garrido C, Soriano-Sarabia N, Margolis D M. 2014. Eradicating HIV-1 infection: seeking to clear a persistent pathogen. *Nat Rev Microbiol* 12, 750–64.

Arias CF, DuBois RM. 2017. The Astrovirus Capsid: A Review . *Viruses* 9(1): 15.

Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. 2009. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog* 5(4):e100039.

Attili SV, Gulati AK, Singh VP. 2006. Diarrhea, CD4 counts and enteric infections in a hospital - based cohort of HIV-infected patients around Varanasi, India. *BMC Infect Dis* 6:39.

Basu G, Rossouw J, Sebunya TK, Gashe BA, de Beer M, Dewar JB, Steele AD. 2003. Prevalence of rotavirus, adenovirus and astrovirus infection in young children with gastroenteritis in Gaborone, Botswana. *East Afr. Med. J.* 80:652-655.

Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, *et al.* 2010. Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF: Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* 5:375 (9730):1969-1987.

Boone SA, Gerba CP. 2007. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease. *Appl Environ Microbiol* 73(6):1687-96.

Bosch A, Pintó RM, Guix S. 2014. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev* 27(4):1048-74.

Bull RA, Tu ET, Mciver CJ, Rawlinson WD, White PA. 2006. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 44: 327-333.

Burton DR. 2006. Structural biology: images from the surface of HIV. *Nature* 441 (7095):817-818.

Caballero S, Guix S, El-Senousy WM, Calicó I, Pintó RM, Bosch A. 2003. Persistent gastroenteritis in children infected with astrovirus: association with serotype-3 strains. *J Med Virol* 71(2):245-50.

Campos GS, Silva Sampaio ML, Menezes AD, Tigre DM, Moura Costa LF, Chinalia FA, Sardi SI. 2016. Human bocavirus in acute gastroenteritis in children in Brazil. *J Med Virol* 88(1):166-70.

Cardoso D, Fiaccadori FS, Souza M, Martins RM, Leite JP. 2002. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiania, Goias, Brazil. *Med Sci Monit* 8:624-628.

Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM, Fialho AM, de Assis RM, *et al.* 2009. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis* 15(1):95-7.

Carraturo A, Catalani V, Tega L. 2008. Microbiological and epidemiological aspects of rotavirus and enteric adenovirus infections in hospitalized children in Italy. *New Microbiol* 31(3):329-36.

Castro ED, Germini MC, Mascarenhas JD, Gabbay YB, de Lima IC, Lobo Pdos S, Fraga VD, Conceição LM, Machado RL, Rossit AR. 2015. Enteropathogens detected in a daycare center, Southeastern Brazil: bacteria, virus, and parasite research. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 57(1):27-32.

Chawla R, Ichhpujani RL. 2011. Enteric spore-forming opportunistic parasites in HIV/AIDS. *Trop Parasitol* 1:15-19.

Chhabra P, Payne DC, Szilagyi PG, Edwards KM, Staat MA, Shirley SH, *et al.* 2013. Etiology of viral gastroenteritis in children & It 5 years of age in the United States, 2008-2009. *J Infect Dis* 208:790-800.

Chhabra P, Walimbe AM, Chitambar SD. 2010. Molecular characterization on three novel intergenotype norovirus GII recombinant strains from western India. *Virus Res* 147:242-246.

Chikhi-Brachet R, Bon F, Toubiana L, Pothier P, Nicolas JC, Flahault A, *et al.* 2002. Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. *J Clin Microbiol* 40:4266-72.

Chakravarty S, Hutson AM, Estes MK, Prasad BV. 2005. Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *J Virol* 79(1):554-568.

Cheng WX, Jin Y, Duan ZJ, Xu ZQ, Qi HM, Zhang Q, *et al.* 2008. Human bocavirus in children hospitalized for acute gastroenteritis: a case-control study. *Clin Infect Dis* 47(2):161-167.

Chitambar S, Gopalkrishna V, Chhabra P, Patil P, Verma H, Lahon A, *et al.* 2012. Diversity in the enteric viruses detected in outbreaks of gastroenteritis from Mumbai, Western India. *Int J Environ Res Public Health* 9(3):895-915.

Chow BD & Esper FP. 2009. The human bocaviruses: a review and discussion of their role in infection. *Clin Lab Med* 29(4):695-713.

Chow BD, Ou Z, Esper FP. 2010. Newly recognized bocaviruses (HBoV, HBoV2) in children and adults with gastrointestinal illness in the United States. *J Clin Virol* 47(2):143-147.

Clarke IN, Estes MK, Green KY, Hansman GS, Knowles NJ, Koopmans MK *et al.* Caliciviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier: 2012. P: 977-86.

Corcoran MS, van Well GT, van Loo IH. 2014. Diagnosis of viral gastroenteritis in children: interpretation of real-time PCR results and relation to clinical symptoms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33(10): 1663-73.

Cunliffe NA, Dove W, Gondwe JS, Thindwa BD, Greensill J, Holmes JL *et al.* 2002. Detection and characterisation of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol*. 67(4):563-6.

Cunliffe NA, Gondwe JS, Kirkwood CD, Graham SM, Nhlane NM, Thindwa BD, *et al.* 2001. Effect of concomitant HIV infection on presentation and outcome of rotavirus gastroenteritis in Malawian children. *Lancet*. 358(9281):550-5.

Cunningham AL, Grohman GS, Harkness J, Law C, Marriott D, Tindall B *et al.* 1988. Gastrointestinal viral infections in homosexual men who were symptomatic and seropositive for human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 158(2):386-91.

Curlin ME, Huang ML, Lu X, Celum CL, Sanchez J, Selke S, Baeten JM, Zuckerman RA, Erdman DD, Corey L. 2010. Frequent detection of human adenovirus from the lower gastrointestinal tract in men who have sex with men. *PLoS One* 5(6):e11321.

Cruz, J. R., A. V. Bartlett, J. E. Herrmann, P. Caceres, N. R. Blacklow, F. Cano. 1992. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J Clin Microbiol* 30:1140-1144.

Dábilla N, Nunes Vieira Almeida T, Carvalho Rebouças Oliveira A, Kipnis A, Neres Silva T, Souza Fiaccadori F *et al.* 2017. Norovirus in feces and nasopharyngeal swab of children with and without acute gastroenteritis symptoms: First report of GI.5 in Brazil and GI.3 in nasopharyngeal swab. *J Clin Virol*. 87:60-66.

Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312(5996): 763-767.

de Andrade JS, Rocha MS, Carvalho-Costa FA, Fioretti JM, Xavier MP, Nunes ZM, *et al.* 2014. Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. *J Clin Virol* 61(3): 345-52.

de Groot NG, Bontrop RE. 2013. The HIV-1 pandemic: does the selective sweep in chimpanzees mirror humankind's future? *Retrovirology* 10:53.

De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-Van Dillen P, Van Doornum GJ *et al.* 1999. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 37:3940-3945.

De Oliveira-Silva MB, De Oliveira LR, Resende JC *et al.* 2007. Seasonal profile and level of CD4+ lymphocytes in the occurrence of cryptosporidiosis and cystoisosporidiosis in HIV/AIDS patients in the Triângulo Mineiro region, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40:512-515.

Desselberger U. 2014. Rotaviruses. *Virus Res* 190:75-96.

Dikman AE, Schonfeld E, Srisarajivakul NC, Poles MA. 2015. Human Immunodeficiency Virus-Associated Diarrhea: Still an Issue in the Era of Antiretroviral Therapy. *Dig Dis Sci* 60:2236-45.

Dina J, Vabret A, Gouarin S, Petitjean J, Lecoq J, Brouard J *et al.* 2009. Detection of human bocavirus in hospitalised children. *J Paediatr Child Health* 45: 149-153.

Dionisio D, Arista S, Vizzi E, Manneschi LI, Di Lollo S, Trotta M, *et al.* 1997. Chronic intestinal infection due to subgenus F type 40 adenovirus in a patient with AIDS. *Scand J Infect Dis* 29(3):305-307.

Drexler JF, Baumgarte S, de Souza Luna LK, *et al.* 2011. Aichi virus shedding in high concentrations in patients with acute diarrhea. *Emerg Infect Dis* 17: 1544-48.

Durepaire N, Ranger-Rogez S, Gandji JA, Weinbreck P, Rogez JP, Denis F. 1995. Enteric prevalence of adenovirus in human immunodeficiency virus seropositive patients. *J Med Virol* 45(1):56-60.

Dwivedi KK, Prasad G, Saini S, Mahajan S, Lal S, Baveja UK. 2007. Enteric opportunistic parasites among HIV infected individuals: associated risk factors and immune status. *Jap. J. infect. Dis* 60: 76-81.

Eden JS, Tanaka MM, Boni MF, Rawlinson WD, White PA. 2013. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J Virol* 87:6270–82.

Edwards P, Wodak, A, Cooper DA, Thompson IL, Penny, R. 1990. The gastrointestinal manifestations of AIDS. *Aust NZ J Med* 20:141-8.

Elfstrand L, Florén CH. 2010. Management of chronic diarrhea in HIV-infected patients: Current treatment options, challenges and future directions. *HIV AIDS (Auckl)* 2:219-24.

Elhag WI, Saeed HA, Omer EFE, Ali AS. 2013. Prevalence of rotavirus and adenovirus associated with diarrhea among displaced communities in Khartoum, Sudan. *BMC Infect Dis* 13: 209.

Enserink R, van den Wijngaard C, Bruijning-Verhagen P, van Asten L, Mughini-Gras L, *et al.* 2015. Gastroenteritis attributable to 16 enteropathogens in children attending day care: significant effects of rotavirus, norovirus, astrovirus, Cryptosporidium and Giardia. *Pediatr Infect Dis J* 34(1):5-10.

Estes MK. 2001. Rotavirus and their replication In: Knipe DM, Rowley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizaman B. *Fields Virology*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Williams &Wilkins pp. 1747-85.

Estes, MK, Greenberg, HB. 2013. Rotaviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., *et al.* (Eds.), *Fields Virology*. , 6<sup>th</sup> ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 1347-1401.

Estes MK, Kapikian AZ. 2007. Rotaviruses. In *Fields Virology*, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Straus SE (eds), 5<sup>th</sup> Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins pp. 1917-1974.

Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoï B, Buttò S. 2010. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita* 46(1):5-14.

Farkas T, Cross RW, Hargitt E, Leche NW, Morrow AL, Sestak K. 2010. Genetic diversity and histo-blood group antigen interactions of rhesus enteric caliciviruses. *J Virol* 84:8617-8625.

Farkas T, Sestak K, Wei C, Jiang X. 2008. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol* 82:5408-5416.

Ferreira MSR, Victoria M, Carvalho-Costa FA, Vieira CB, Xavier MPTP, Fioretti JM, *et al.* 2010. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005-2008. *J Med Virol* 82:1442-1448.

Ferreira MSR, Xavier M da P, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM, *et al.* 2012. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). *PLoS One* 7(3):e33754.

Ferreira RG, Borges AMT, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Santos RAT, Cardoso DDP. 2010. Gastroenteric virus detection in fecal samples from womem in Goiânia, State of Goiás, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 43:240-243.

Fioretti JM, Bello G, Rocha MS, Victoria M, Leite JP, Miagostovich MP. 2014. Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. *PLoS One* 9(3):e92988.

Fioretti JM, Ferreira MS, Victoria M, Vieira CB, Xavier Mda P, Leite JP, Miagostovich MP. 2011. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(8):942-7.

Filho EP, da Costa Faria NR, Fialho AM, de Assis RS, Almeida MM, Rocha M, *et al.* 2007. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and

community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *J Med Microbiol* 56:313-319.

Florescu DF, Pergam SA, Neely MN, Qiu F, Johnston C, Way S, *et al.* 2012. Safety and efficacy of CMX001 as salvage therapy for severe adenovirus infections in immunocompromised patients. *Biol Blood Marrow Transplant.*18(5):731-8.

Fontaine O, Kosek M, Bhatnagar S, Boschi-Pinto C, Chan KY, Duggan C, 2009. Setting Research Priorities To Reduce Global Mortality from Childhood Diarrhoea by 2015. *PLoS Med* 6: e1000041.

Fontana M, Zuin G, Mammino A, Tocalli L, Marchisio P, Principi N. 1997. Rotavirus infection and diarrhea in healthy and HIV-infected children: a cohort study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24(3):367.

Fox JP, Hall CE, Cooney MK. 1977. The Seattle Virus Watch. VII. Observations of adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 105(4):362-86.

Freed E O. 2001. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 26(1-6):13-33.

Fumian TM, Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, Siqueira JA, Soares LS, Linhares AC, Gabbay YB. 2012. Detection of a novel recombinant strain of norovirus in an African-descendant community from the Amazon region of Brazil in 2008. *Arch Virol* 157(12):2389-92.

Fumian TM, da Silva Ribeiro de Andrade J, Leite JP, Miagostovich MP. 2016. Norovirus Recombinant Strains Isolated from Gastroenteritis Outbreaks in Southern Brazil, 2004-2011. *PLoS One* 11(4):e0145391.

Fumian TM, Justino MC, D'Arc Pereira Mascarenhas J, Reymão TK, Abreu E, Soares L, Linhares AC, Gabbay YB. 2013. Quantitative and molecular analysis of noroviruses RNA in blood from children hospitalized for acute gastroenteritis in Belém, Brazil. *J Clin Virol.* 58(1):31-5.

Gabbay YB, Linhares AC, Cavalcante-Pepino EL, Nakamura LS, Oliveira DS, da Silva LD, *et al.* 2007a. Prevalence of human astrovirus genotypes associated with acute gastroenteritis among children in Belém, Brazil. *J Med Virol* 79(5):530-8.

Gabbay YB, Linhares AC, Oliveira DS, Nakamura LS, Mascarenhas JD, Gusmão RH, *et al.* 2007b. First detection of a human astrovirus type 8 in a child with diarrhea in Belém, Brazil: comparison with other strains worldwide and identification of possible three lineages. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(4):531-4.

Gabbay YB, Luz CR, Costa IV, Cavalcante-Pepino EL, Sousa MS, *et al.* 2005. Prevalence and genetic diversity of astroviruses in children with and without diarrhea in São Luís, Maranhão, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 (7):709-14.

Gabbay YB, Silva LD & Gomes MLC. 2001. Viral enteropathogens in gastroenteritis episodes among HIV infected patients. In: 12th National Meeting of Virology a 4th Mercosul Meeting of Virology, Caldas Novas, Brazil, 2001. *Virus Rev Res* 6:2 suppl.1.

Gallimore CI, Barreiros MA, Brown DW, Nascimento JP, Leite JP. 2004. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 37(3):321-6.

Garnett CT, Erdman D, Xu W, Gooding LR. 2002. Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J Virol* 76:10608-16.

Garnett CT, Talekar G, Mahr JA, Huang W, Zhang Y, Ornelles DA, *et al.* 2009. Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. *J Virol* 83:2417-28.

Garbino J, Inoubli S, Mossdorf E, Weber R, Tamm M, Soccal P, *et al.* 2008. Swiss HIV Cohort Study. Respiratory viruses in HIV-infected patients with suspected respiratory opportunistic infection. *AIDS* 22(6):701-5.

Gassama A, Sow PS, Fall F, Camara P, Guèye-N'diaye A, Seng R, *et al.* 2001. Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in Senegalese adults in relation to human immunodeficiency virus serostatus. *Int J Infect Dis* 5(4):192-8.

Ghebremedhin B. 2014. Human Adenovirus: Viral Pathogen With Increasing Importance. *Euro J of Microbiol and Immunol* 4:26-33.

Giordano MO, Martinez LC, Rinaldi D, Espul C, Martinez N, Isa MB, *et al.* 1999. Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. *AIDS Res hum Retroviruses* 15:1427-1432.

Glass RI, Noel J, Mitchell D, Herrmann JE, Blacklow NR, Pickering LK *et al.* 1996. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch Virol Suppl*, 12:287-300.

Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, *et al.* 2000. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 181: S254-261. Review.

Goto T, Ashina T, Fujiyoshi Y, Kume N, Yamagishi H, Nakai M. 1994. Projection structures of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) observed with high resolution electron cryo-microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)* 43(1):16-9.

Goodgame R. 2006. Norovirus gastroenteritis. *Curr Gastroenterol Rep* 8(5):401-408. Review.

Goodgame R. 2007. Norovirus gastroenteritis. *Curr Infect Dis Rep* 9(2):102-109.

Gonçalves ACM, Gabbay YB, Mascarenhas JD, *et al.* 2009. Calicivirus and Giardia lamblia are associated with diarrhea in human immunodeficiency virus-seropositive patients from southeast Brasil. *Am J Trop Med Hyg* 81:463-466.

González GG, Pujol FH, Liprandi F, Deibis L, Ludert JE. 1998. Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. *J Med Virol* 55(4):288-92.

Goyer M, Aho LS, Bour JB, Ambert-Balay K, Pothier P. 2008. Seroprevalence distribution of Aichi virus among a French population in 2006-2007. *Arch Virol* 153: 1171-1174.

Green M, Pina M. 1963. Biochemical studies on adenovirus multiplication. IV. Isolation, purification, and chemical analysis of adenovirus. *Virology* 20:199-207.

Greenberg HB, Estes MK. 2009. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology* 136(6):1939-51.

Griffin GE 1990. Malabsorption, malnutrition and HIV disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 4(2):361-73. Review.

Grohmann GS, Glass RI, Pereira HG, Monroe SS, Hightower AW, Weber R, *et al.* 1993. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 1 329(1):14-20. Review.

Grunfeld C, Feingold KR. 1992. Metabolic disturbances and wasting in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 327(5):329-37. Review.

Guarino A, Russo S, Castaldo A, Spagnuolo MI, Tarallo L, Rubino A. 1996. Passive immunotherapy for rotavirus-induced diarrhoea in children with HIV infection. *AIDS* 10(10):1176-8.

Guido M, Quattrocchi M, Campa A, Zizza A, Grima P, Romano A, De Donno A. 2011. Human metapneumovirus and human bocavirus associated with respiratory infection in Apulian population. *Virology* 417(1):64-70.

Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, *et al.* 2016. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol* 22(39):8684-8697.Review.

Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolomé R, Latorre C, Rabella N *et al.* 2002. Molecular Epidemiology of Astrovirus Infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol* 40: 133-139.

Guo L, Xu X, Song J, Wang W, Wang J, Hung T. 2010. Molecular characterization of astrovirus infection in children with diarrhea in Beijing, 2005-2007. *J Med Virol.* 82(3):415-23.

Hardy ME. 2005. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Letter* 253(1):1-8.

Harsi CM, Rolim DP, Gomes SA, Gilio AE, Stewien KE, Baldacci ER, Candeias JA. 1995. Adenovirus genome types isolated from stools of children with gastroenteritis in Sao Paulo, Brazil. *J Med Virol* 45(2):127-134.

Hernandez Jd, da Silva LD, Sousa Junior EC, de Lucena MS, Soares Lda S, Mascarenhas JD, Gabbay YB. 2016. Analysis of uncommon norovirus recombinants from Manaus, Amazon region, Brazil: GII.P22/GII.5, GII.P7/GII.6 and GII.Pg/GII.1. *Infect Genet Evol* 39:365-71.

Herrmann, J. E., R. W. Hudson, D. M. Perron-Henry, J. B. Kurtz, and N. R. Blacklow. 1988. Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus- specific monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 158:182-185.

Hierholzer JC. Adenoviruses in the immunocompromised host. 1992. *Clin Microbiol Rev* 5(3):262-74.

Hiwarkar P, Gaspar HB, Gilmour K, Jagani M, Chiesa R, Bennett-Rees N, *et al.* 2013. Impact of viral reactivations in the era of pre-emptive antiviral drug therapy following allogeneic haematopoietic SCT in paediatric recipients. *Bone Marrow Transplant* 48: 803-808.

Hoffman JA. Adenovirus infections in solid organ transplant recipients. 2009. *Curr Opin Organ Transplant* 14(6):625-33.

Horwitz MS. 2001. Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields virology*. Philadelphia: LippincottWilliams andWilkins. pp 2301- 2326.

Ishiko H, Shimada Y, Konno T, Hayashi A, Ohguchi T, Tagawa Y, *et al.* 2008. Novel human adenovirus causing nosocomial epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Microbiol* 46(6): 2002-8.

Ison MG. 2006. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 43:331–339.

Ison MG, Green M, the AST Infectious Diseases Community of Practice. 2009. Adenovirus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 9:S161-5.

Rajarapu G. 2014. Genes and Genome of HIV-1. *J Phylogen Evolution Biol* 2: 126.

Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. 2012. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol* 22(1):46-64.

Jin Y, Cheng WX, Yang XM, Jin M, Zhang Q, Xu ZQ, *et al.* 2009. Viral agents associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Lanzhou, China. *J Clin Virol* 44(3):238-41.

Jonsson N, Wahlström K, Svensson L, *et al.* 2012. Aichi virus infection in elderly people in Sweden. *Arch Virol* 157(7):1365-69.

Juckett G & Trivedi R. 2011. Evaluation of Chronic Diarrhea. *American Family Physician* 84 (10):1119-1126.

Kaikkonen S, Räsänen S, Rämetsä M. 2010. Aichi virus infection in children with acute gastroenteritis in Finland. *Epidemiol Infect* 138:1166-1171.

Kalish JT, Ling JP, Gold JW, Laughon BE, Bartlett JG, Kotler DP, *et al.* 1989. Prevalence of acute enteric viral pathogens in acquired immunodeficiency syndrome patients with diarrhea. *Gastroenterology* 97(4):1031-2.

Kantola K, Hedman L, Arthur J, Alibeto A, Delwart E, Jartti T, *et al.* 2011. Seroepidemiology of human bocaviruses 1-4. *J Infect Dis* 204:1403-1412.

Kapikian AZ. 2001. A rotavirus vaccine for prevention of severe diarrhoea of infants and young children: development, utilization and withdrawal. *Novartis Found Symp* 238:153-171; discussion 171-179.

Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaukat S, *et al.* 2009. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis* 199(2):196-200.

Kapoor A, Simmonds P, Dubovi EJ, Qaisar N, Henriquez JA, Medina J, *et al.* 2011. Characterization of a canine homolog of human Aichivirus. *J Virol* 85: 11520-11525.

Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, *et al.* 2010. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis* 201(11):1633-43.

Kassuto S, Rosenberg E. 2004. Primary HIV type 1 infection. *Clinical Infectious Diseases* 38:1447–1453.

- Khamrin P, Malasao R, Chaimongkol N, Ukarapol N, Kongsricharoern T, *et al.* 2012a. Circulating of human bocavirus 1, 2, 3, and 4 in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect Genet Evol* 12:565-569.
- Khamrin P, Okame M, Thongprachum A, Nantachit N, Nishimura S, Okitsu S, *et al.* 2011. A single-tube multiplex PCR for rapid detection in feces of 10 viruses causing diarrhea. *J Virol Methods* 173(2):390-393.
- Khamrin P, Thongprachum A, Shimizu H, Okitsu S, Mizuguchi M, Hayakawa S, *et al.* 2012b. Detection of human bocavirus 1 and 2 from children with acute gastroenteritis in Japan. *J Med Virol* 84(6):901-5.
- Kilgore PE, Glass RI. 1997. Gastrointestinal syndromes. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds. *Clinical Virology*. New York: Churchill Livingstone 55-67.
- Kitajima M, Gerba CP. 2015. Aichi virus 1: environmental occurrence and behavior. *Pathogens* 4(2):256-68.
- Kiulia NM, Mwenda JM, Nyachieo A, Nyaundi JK, Steele AD, 2007. Taylor MB. Astrovirus infection in young Kenyan children with diarrhoea. *J Trop Pediatr*. 53(3):206-9.
- Kiulia NM, Nyaundi JK, Peenze I, Nyachieo A, Musoke RN, Steele AD, *et al.* 2009. Rotavirus infections among HIV-infected children in Nairobi, Kenya. *J Trop Pediatr* 55(5):318-23.
- Khoo SH, Bailey AS, de Jong JC, Mandal BK. 1995. Adenovirus infections in human immunodeficiency virus-positive patients: clinical features and molecular epidemiology. *J Infect Dis*. 172(3):629-37.
- Koopmans M & Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol* 90(1):23-41. Review.
- Koskenvuo M, Möttönen M, Waris M, Allander T, Salmi TT, Ruuskanen O. 2008. Human bocavirus in children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Pediatr* 167(9):1011-5.

- Kosulin K, Geiger E, Vécsei A, Huber WD, Rauch M, Brenner E, *et al.* 2016. Persistence and reactivation of human adenoviruses in the gastrointestinal tract. *Clin Microbiol Infect* 22(4):381.e1-8.
- Kroneman A, Harris J, Vennema H, Duizer E, van Duynhoven Y, Gray J, *et al.* 2008. Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for food-borne viruses. *J Public Health (Oxf)* 30:82-90.
- Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, *et al.* 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol* 158:2059-2068.
- Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort HV, Peñaranda S, Oberste MS, *et al.* 2011. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol* 51:121-125
- La Rosa G, Della LS, Iaconelli M, Donia D, Cenko F, Xhelilaj G, *et al.* 2016. Divizia M. Human bocavirus in children with acute gastroenteritis in Albania. *J Med Virol* 88(5):906-910.
- La Rosa G, Della LS, Petricca S, Iaconelli M, Donia D, Saccucci P, *et al.* 2015. Genetic Diversity of Human Adenovirus in Children with Acute Gastroenteritis, Albania, 2013-2015. *Biomed Res Int* 1429-12.
- Lamberti LM, Fischer Walker CL, Noiman A, Victora C, Black RE. 2011. Breastfeeding and the risk for diarrhea morbidity and mortality. *BMC Public Health* 11 Suppl 3:S15. Review.
- Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE; Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. 2013. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One* 8(9):e72788.
- Lasure N, Gopalkrishna V. 2017. Molecular epidemiology and clinical severity of Human Bocavirus (HBoV) 1-4 in children with acute gastroenteritis from Pune, Western India. *J Med Virol* 89(1):17-23.

Lau SK, Yip CC, Que TL, Lee RA, Au-Yeung RK, Zhou B, *et al.* 2007. Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong. *J Infect Dis* 196:986-993.

Laughon BE, Druckman DA, Vernon A, Quinn TC, Polk BF, Modlin JF, *et al.* 1988. Prevalence of enteric pathogens in homosexual men with and without acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology* 94(4):984-93.

Leblanc D, Inglis GD, Boras VF, Brassard J, Houde A. 2017. The prevalence of enteric RNA viruses in stools from diarrheic and non-diarrheic people in southwestern Alberta, Canada. *Arch Virol* 162(1):117-128.

Le Guyader FS, le Saux JC, Ambert-Balay K, Krol J, Serais O, Parnaudeau S, *et al.* 2008. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *J Clin Microbiol* 46:4011-4017.

Lekana-Douki SE, Kombila-Koumavor C, Nkoghe D, Drosten C, Drexler JF, Leroy EM. 2015. Molecular epidemiology of enteric viruses and genotyping of rotavirus A, adenovirus and astrovirus among children under 5 years old in Gabon. *Int J Infect Dis* 34:90-5.

Lee JI, Chung JY, Han TH, Song MO, Hwang ES. 2007. Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *J Infect Dis* 196(7):994-997.

Lee TW, Kurtz JB. 1994. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol Infect* 112:187-93.

Leite JP, Barth OM, Schatzmayr HG. 1991. Astrovirus in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 489-490.

Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. 2008. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:745-53.

Leite JPG, Pereira HG, Azeredo RS, Schatzmayr HG. 1985. Adenoviruses in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 15:203-209.

Lekana-Douki SE, Kombila-Koumavor C, Nkoghe D, Drosten C, Drexler JF, Leroy EM. 2015 . Molecular epidemiology of enteric viruses and genotyping of rotavirus A, adenovirus and astrovirus among children under 5 years old in Gabon. *Int J Infect Dis.* 34:90-5.

Leung AK, Kellner JD, Davies HD. 2005. Rotavirus gastroenteritis. *Adv Ther* 22(5):476-87. Review.

Lew JF, Moe CL, Monroe SS *et al.* 1991. Astrovirus and adenovirus associated with diarrhea in children in day care settings. *J Infect Dis* 164:673-8.

Linhares AC & Justino MC. 2014. Rotavirus vaccination in Brazil: effectiveness and health impact seven years post-introduction. *Expert Rev Vaccines* 13(1):43-57.

Lion T. 2014. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 27(3):441-62.

Liste MB, Natera I, Suarez JA, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE. 2000. Enteric virus infections and diarrhea in healthy and human immunodeficiency virus-infected children. *J Clin Microbiol* 38(8):2873-7.

Liu L, Hill K, Oza S, Hogan D, Yue C, Cousens S, *et al.* 2016. Levels and Causes of Mortality under Age Five Years. In *Disease Control Priorities (third edition): Volume 2, Reproductive, Maternal, Newborn, and Child Health*, edited by R. Black, R. Laxminarayan, M. Temmerman, and N. Walker. Washington, DC: World Bank.

Liu CY, Shen KL, Wang SX, Liu YY, Zhaori GT. 2004. Astrovirus infection in young children with diarrhea hospitalized at Beijing Children's Hospital. *Chin Med J (Engl)*. 117(3):353-6

López L, Castilho FJ, Fernández MA *et al.* 2000. Astrovirus infection among children with gastroenteritis in the city of Zaragoza, Spain. *Eur J Clin Microbiol Dis* 19 : 545-7.

Luchs A, Madalosso G, Cilli A, Morillo SG, Martins SR, de Souza KA, Namiyama GM *et al.* 2016. Outbreak of G2P[4] rotavirus gastroenteritis in a retirement community, Brazil, 2015: An important public health risk? *Geriatr Nurs pii: S0197-4572(16)30238-5*.

- Luchs A & Timenetsky MC. 2016. Group A rotavirus gastroenteritis: post-vaccine era, genotypes and zoonotic transmission. *Einstein* (São Paulo). 14(2):278-87.
- Machado AA, Owa MA, de Freitas-Silva G, Figueiredo Fde C, Martinez R. 1996. Rotavirus studied in the feces of 10 patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Rev Soc Bras Med Trop* 29(3):283-4.
- Magalhães GF, Nogueira PA, Grava AF, Penati M, Silva LH, Orlandi PP. 2007. Rotavirus and adenovirus in Rondônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(5):555-7.
- Magwalivha M, Wolfaardt M, Kiulia NM, van Zyl WB, Mwenda JM, Taylor MB. 2010. High prevalence of species D human adenoviruses in fecal specimens from Urban Kenyan children with diarrhea. *J Med Virol* 82:77-84.
- Maldonado Y, Cantwell M, Old M, Hill D, Sanchez ML, Mogan L, *et al.* 1998. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *J Infect Dis* 178:334-339.
- Mans J, Murray TY, Kiulia NM, Mwenda JM, Musoke RN, Taylor MB. 2014. Human caliciviruses detected in HIV-seropositive children in Kenya. *J Med Virol* 86(1):75-81.
- Marshall JA, Bruggink LD, Sturge K, Subasinghe N, Tan A, Hogg GG. 2007. Molecular features of astrovirus associated with a gastroenteritis outbreak in an aged-care centre. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26:67-71.
- Matsui SM, Greenberg, HB 2001. Astroviruses. In: Kluwer Health/Lippincott, WAW (Ed.). *Fields Virology*. Philadelphia, pp.875-893.
- Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM *et al.* 2008. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol* 82(7):3204-19.
- Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, *et al.* 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 156(8):1397-413.

Matthijnssens J, Miño S, Papp H, Potgieter C, Novo L, Heylen E, *et al.* 2012. Complete molecular genome analyses of equine rotavirus A strains from different continents reveal several novel genotypes and a largely conserved genotype constellation. *J Gen Virol* 93(Pt 4):866-75.

Maunula L, Kalso S, Von Bonsdorff CH, Ponka A. 2004. Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. *Epidemiol Infect* 132:737-43.

McGowan I, Chalmers A, Smith GR, Jewell D. 1997. Advances in mucosal immunology. *Gastroenterol Clin North Am* 26:145-73.

McIver CJ, Hansman G, White P, Doultree JC, Catton M, Rawlinson WD. 2001. Diagnosis of enteric pathogens in children with gastroenteritis. *Pathology* 33:353-358.

Medina SM, Gutierrez MF, Liprandi F, Ludert JE. 2000. Identification and Type Distribution of Astroviruses among Children with Gastroenteritis in Colombia and Venezuela. *J Clin Microbiol* 38: 3481-3483.

Mendez E, Arias CF 2007. Astroviruses. In: Wilkins LWA (Ed.). *Fields Virology*. Philadelphia, p.981–1000.

Méndez E, Fernández-Luna T, López S, Méndez-Toss M, Arias CF. 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J Virol* 76(16):7996-8002.

Mendez-Toss M, Griffin DD, Calva J, Contreras JF, Puerto FI, Mota F, *et al.* 2004. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *J Clin Microbiol* 42: 151-157.

Mesquita JR, Barclay L, Nascimento MS, Vinjé J. 2010. Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg Infect Dis* 16:980-982.

Mihalov-Kovács E, Gellért Á, Marton S, Farkas SL, Fehér E, Oldal M *et al.* 2015. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg Infect Dis* 21(4):660-3.

Mitui MT, Bozdayi G, Ahmed S, Matsumoto T, Nishizono A, Ahmed K. 2014. Detection and molecular characterization of diarrhea causing viruses in single and mixed infections in children: a comparative study between Bangladesh and Turkey. *J Med Virol* 86(7):1159-68.

Monastiri A, Aouni M, Guix S, Mechri B, Lopez-Roig M, Abid NB, *et al.* 2016. Clinical surveillance for human astrovirus in Monastir region, Tunisia. *BMC Public Health* 21:16:57.

Mönkemüller KE & Wilcox CM. 2000. Investigation of diarrhea in AIDS. *Can J Gastroenterol* 14:933-940.

Moore J P, Trkola A, Dragic T. 1997. Co-receptors for HIV-1 entry. *Current opinion in immunology* 9(4): 551–62.

Moyo SJ, Blomberg B, Hanevik K, Kommedal O, Vainio K, Maselle SY *et al.* 2014a. Genetic diversity of circulating rotavirus strains in Tanzania prior to the introduction of vaccination. *PLoS One* 20;9(5):e97562.

Moyo SJ, Hanevik K, Blomberg B, Kommedal O, Nordbø SA, Maselle S, *et al.* 2014c. Prevalence and molecular characterisation of human adenovirus in diarrhoeic children in Tanzania; a case control study. *BMC Infect Dis* 14:666.

Moyo SJ, Hanevik K, Blomberg B, Kommedal O, Vainio K, Maselle S, Langeland N. 2014b. Genetic diversity of norovirus in hospitalised diarrhoeic children and asymptomatic controls in Dar es Salaam, Tanzania. *Infect Genet Evol* 26:340-7.

Moore PL, Steele AD, Alexander JJ. 2000. Relevance of commercial diagnostic tests to detection of enteric adenovirus infections in South Africa. *J Clin Microbiol* 38(4):1661-1663.

Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Carmona RCC, Neme SN, Timenetsky MCST. 2010. Rotavirus genotype G4P[8] and enteric adenovirus in HIV-positive patients with and without diarrhoea in São Paulo State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 104:165-167.

Munos MK. 2010. The effect of oral rehydration solution and recommended home fluids on diarrhoea mortality. *International Journal of Epidemiology* 39(Suppl 1):i75-i87.

Mustafa H, Polombo EA, Bishop RF. 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J Clin Microbiol* 38: 1058-62.

Nájera R, Herrera MI, de Andrés R. 1987. Human immunodeficiency virus and related retroviruses. *West J Med* 147(6):702-708.

Nakawesi JS, Wobudeya E, Ndeezi G, Mworozi EA, Tumwine JK. 2010. Prevalence and factors associated with rotavirus infection among children admitted with acute diarrhea in Uganda. *BMC Pediatr* 10:69. doi: 10.1186/1471-2431-10-69.

Nguyen TA, Hoang L, Pham le D, Hoang KT, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. 2008. Identification of human astrovirus infections among children with acute gastroenteritis in the Southern Part of Vietnam during 2005-2006. *J Med Virol* 80(2):298-305.

Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, Larson G, Johansen K, Ekspong A, et al. 2003. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol* 77(24):13117-13124.

Niyogi SK, Saha MR, De SP. 1994. Enteropathogens associated with acute diarrhoeal diseases. *Indian J publ Hlth* 38:29-32.

Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 33(4):797-801.

Nunes MC, Kuschner Z, Rabede Z, Madimabe R, Van Niekerk N, Moloji J et al. 2014. Clinical epidemiology of bocavirus, rhinovirus, two polyomaviruses and four coronaviruses in HIV-infected and HIV-uninfected South African children. *PLoS One* 9(2):e86448.

Oh D, Schreier E. 2001. Molecular characterization of human astroviruses in Germany. *Arch Virol* 146 (3):443-55.

- Oh DY, Gaedicke G, Schreier E. 2003. Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity. *J Med Virol* 71:82-89.
- Oh DY, Silva PA, Hauroeder B, Diedrich S, Cardoso DDP, Schreier E. 2006. Molecular characterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America. *Arch Virol* 151:1199-1206.
- Okitsu-Negishi S, Nguyen TA, Phan TG, Ushijima H. 2004. Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. *Pediatr Int* 46:245-252.
- Oshitani H, Kasolo FC, Mpabalwani M, Luo NP, Matsubayashi N, Bhat GH *et al.* 1994. Association of rotavirus and human immunodeficiency virus infection in children hospitalized with acute diarrhea, Lusaka, Zambia. *J Infect Dis* 169(4):897-900.
- Oude Munnink BB, Canuti M, Deijs M, de Vries M, Jebbink MF, Rebers S *et al.* 2014. Unexplained diarrhoea in HIV-1 infected individuals. *BMC Infect Dis* 14:22.
- Quédraogo N, Kaplon J, Bonkougou IJ, Traoré AS, Pothier P, Barro N *et al.* 2016. Prevalence and Genetic Diversity of Enteric Viruses in Children with Diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. *PLoS One* 11(4):e0153652.
- Qiao H, Nilsson M, Abreu ER *et al.* 1999. Viral diarrhea in children in Beijing, China. *J Med Virol* 57: 390-6.
- Page NA, Groome MJ, Nadan S, Netshikweta R, Keddy KH, Poonsamy B, *et al.* 2017. Norovirus epidemiology in South African children <5 years hospitalised for diarrhoeal illness between 2009 and 2013. *Epidemiol Infect* 145(9):1942-1952.
- Paloniemi M, Lappalainen S, Salminen M, Kätkä M, Kantola K, Hedman L, *et al.* 2014. Human bocaviruses are commonly found in stools of hospitalized children without causal association to acute gastroenteritis. *Eur J Pediatr* 173(8):1051-1057.
- Parashar UD, Bresee JS, Glass RI. 2003. The global burden of diarrhoeal disease in children. *Bull World Health Organ* 81(4):236.
- Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 14:1224-1231.

Pavia AT, Long EG, Ryder RW, Nsa W, Puhr ND, Wells JG, *et al.* 1992. Diarrhea among African children born to human immunodeficiency virus 1-infected mothers: clinical, microbiologic and epidemiologic features. *Pediatr Infect Dis J* 11(12):996-1003.

Pawlowski SW, Warren CA, Guerrant R. 2009. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterology* 136(6):1874-86. Review.

Pham NTK, Khamrin P, Nguyen TA, Kanti DS, Phan TG, Okitsu S, *et al.* 2007. Isolation and molecular characterization of Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. *J Clin Microbiol* 45:2287-2288.

Pham NTK, Trinh QD, Khamrin P, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, *et al.* 2008, Sequence analysis of the capsid gene of Aichi viruses detected from Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. *J Med Virol* 1222-1227.

Phan TG, Kapusinszky B, Wang C, Rose RK, Lipton HL, Delwart EL. 2011. The fecal viral flora of wild rodents. *PLoS Pathog* (7) e1002218.

Poles MA, Fuerst M, McGowan I, Elliott J, Rezaei A, Mark D, *et al.* 2001. HIV-related diarrhea is multifactorial and fat malabsorption is commonly present, independent of HAART. *Am J Gastroenterol* 96(6):1831-7.

Pollok RC. Viruses causing diarrhoea in AIDS. 2001. *Novartis Found Symp* 238:276-83; discussion 283-8.

Portal TM, Siqueira JA, Costa LC, Lima IC, Lucena MS, Bandeira RS, *et al.* 2016. Caliciviruses in hospitalized children, São Luís, Maranhão, 1997-1999: detection of norovirus GII.12. *Braz J Microbiol* 47(3):724-30.

Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286(5438):287-290.

Proenca-Modena JL, Martinez M, Amarilla AA, Espínola EE, Galeano ME, Fariña N, *et al.* 2013. Viral load of human bocavirus-1 in stools from children with viral diarrhoea in Paraguay. *Epidemiol Infect* 141:2576-2580.

Rajarapu G. 2014. Genes and Genome of HIV-1. *J Phylogen Evolution Biol* 2: 126.

- Räsänen S, Lappalainen S, Kaikkonen S, Hämäläinen M, Salminen M, Vesikari T. 2010. Mixed viral infections causing acute gastroenteritis in children in a waterborne outbreak. *Epidemiol Infect* 138:1227-1234.
- Reis TA, Assis AS, do Valle DA, Barletta VH, de Carvalho IP, Rose TL, *et al.* 2016. The role of human adenoviruses type 41 in acute diarrheal disease in Minas Gerais after rotavirus vaccination. *Braz J Microbiol* 47(1):243-50.
- Ren Z, Kong Y, Wang J, Wang Q, Huang A, Xu H. 2013. Etiological study of enteric viruses and the genetic diversity of norovirus, sapovirus, adenovirus, and astrovirus in children with diarrhea in Chongqing, China. *BMC Infect Dis* 13:412.
- Reuter G, Boldizsár A, Papp G, Pankovics P. 2009. Detection of Aichi virus shedding in a child with enteric and extraintestinal symptoms in Hungary. *Arch Virol* 154:1529-1532.
- Reuter G, Boros A, Pankovics P. 2011. Kobuviruses - a comprehensive review. *Rev Med Virol* 21(1):32-41.
- Rezig D, Bahri O, Ben Ayed N, Ben Yahia A, Sadraoui A, Ayed S, Triki H. 2006. Identification of adenoviruses serotypes implicated in haemorrhagic conjunctivitis in Tunisia. *Pathol Biol* 54:561–565.
- Ribes JM, Montava R, Téllez-Castillo CJ, Fernández-Jiménez M, Buesa J. 2010. Seroprevalence of Aichi Virus in a Spanish Population from 2007 to 2008. *Clin. Vaccine Immunol* 17: 545-549.
- Rimoldi SG, Stefani F, Pagani C, Chenal LL, Zanchetta N, Di Bartolo I, *et al.* 2011. Epidemiological and clinical characteristics of pediatric gastroenteritis associated with new viral agents. *Arch Virol* 156(9):1583-1589.
- Robinson CM, Seto D, Jones MS, Dyer DW, Chodosh J. 2011. Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infect Genet Evol* 11:1208-1217.
- Rodriguez-Baez N, O'Brien R, Qiu SQ, Bass DM. 2002. Astrovirus, adenovirus, and rotavirus in hospitalized children: prevalence and association with gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35(1):64-8.

Rodríguez-Guillén L, Vizzi E, Alcalá AC, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE. 2005. Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. *J Clin Virol* 33(2):104-9.

Rossit AR, de Almeida MT, Nogueira CA, da Costa OJG, Barbosa DM, Moscardini AC *et al.* 2007. Bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from São Paulo State, Southeastern Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57(1):59-66.

Rossit ARB, Gonçalves ACM, Franco C, Machado RLD. 2009. Etiological agents of diarrhea in patients infected by the human immunodeficiency virus-1: A review. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 51(2):59-65.

Russell WC. 2009. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* 90(Pt 1):1-20.

Sá AC, Gómez MM, Lima IF, Quetz JS, Havt A, Oriá RB *et al.* 2015. Group a rotavirus and norovirus genotypes circulating in the northeastern Brazil in the post-monovalent vaccination era. *J Med Virol*. 87(9):1480-90.

Saderi H, Roustai MH, Sabahi F, Sadeghizadeh M, Owlia P, de Jong JC. 2002. Incidence of enteric adenovirus gastroenteritis in Iranian children. *J Clin Virol* 24:1-5.

Santos N, Peret TC, Humphrey CD, Albuquerque MC, Silva RC, Benati FJ, *et al.* 2010. Human bocavirus species 2 and 3 in Brazil. *J Clin Virol* 48:127-130.

Santos VS, Gurgel RQ, Cavalcante SM, Kirby A, Café LP, Souto MJ *et al.* 2017. Acute norovirus gastroenteritis in children in a highly rotavirus-vaccinated population in Northeast Brazil. *J Clin Virol* 88:33-38.

Sanaei Dashti A, Ghahremani P, Hashempoor T, Karimi A. 2016. Molecular Epidemiology of Enteric Adenovirus Gastroenteritis in under-Five-Year-Old Children in Iran. *Gastroenterol Res Pract* 2016:2045697.

Sasaki J, Kusuhara Y, Maeno Y, Kobayashi N, Yamashita T, Sakae K. 2001. Construction of an infectious cDNA clone of Aichi virus (a new member of the

family Picornaviridae) and mutational analysis of a stem-loop structure at the 5' end of the genome. *J Virol* 75:8021-8030.

Saulsbury FT, Winkelstein JA, Yolken 1980 . RH.Chronic rotavirus infection in immunodeficiency. *J Pediatr* 97(1):61-5.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, *et al.* 2011. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17:7-15.

Schildgen O. Human bocavirus: lessons learned to date. 2013. *Pathogens* 2(1):1-12.

Schildgen O, Müller A, Allander T, Mackay IM, Völz S, Kupfer B *et al.* 2008. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev* 21(2):291-304.

Sdiri-Loulizi K, Gharbi-Khélifi H, de Rougemont A, Chouchane S, Sakly N, Ambert-Balay K *et al.* 2008. Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. *Clin Microbiol* 46(4):1349-55.

Sdiri-Loulizi K, Hassine M, Aouni Z, Gharbi-Khelifi H, Sakly N, Chouchane S *et al.* 2010. First molecular detection of Aichi virus in sewage and shellfish samples in the Monastir region of Tunisia. *Arch Virol* 155: 1509–1513.

Sdiri-Loulizi K, Hassine M, Gharbi-Khelifi H, Sakly N, Chouchane S, Guediche MN, *et al.* 2009. Detection and Genomic Characterization of Aichi Viruses in Stool Samples from Children in Monastir, Tunisia. *J Clin Microbiol* 47:2275-2278.

Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. 2007. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru City. *Japan Infect Genet Evol* 7:279–284.

Sherman DS, Fish DN. 2000. Management of protease inhibitor-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 30:908-914.

Sidoti F, Rittà M, Costa C, Cavallo R. 2015. Diagnosis of viral gastroenteritis: limits and potential of currently available procedures. *J Infect Dev Ctries* 49(6):551-561.

Silva AM, Leite EG, Assis RM, Majerowicz S, Leite JP. 2001. An outbreak of gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 in a day care center, in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 1069-1073.

Silva PA, Santos RA, Costa PS, Teixeira JM, Giugliano LG, Andreasi MS, *et al.* 2009. The circulation of human astrovirus genotypes in the Central West Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(4):655-8.

Silva RC, Benati FJ, Pena GP, Santos N. 2010. Molecular characterization of viruses associated with gastrointestinal infection in HIV-positive patients. *Braz J Infect Dis* 14(6):549-52.

Siqueira JA, Linhares Ada C, de Carvalho TC, Aragão GC, Oliveira Dde S, Dos Santos MC *et al.* 2013. Norovirus infection in children admitted to hospital for acute gastroenteritis in Belém, Pará, Northern Brazil. *J Med Virol* 85(4):737-44.

Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, Nemerow GR. 2010. Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 343:195-224.

Soares CC, Volotão EM, Albuquerque MC, da Silva FM, de Carvalho TR, Nozawa CM, *et al.* 2002. Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. *J Clin Virol* 23:171-177.

Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MCM, Adriana GM, Rocha LN, *et al.* 2008. Norovirus Detection and Genotyping for Children with Gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 13:1245-1246.

Sousa TT, Almeida TNV, Fiaccadori FS, Souza M, Badr KR, Cardoso DDDP. 2017. Identification of Human Bocavirus type 4 in a child asymptomatic for respiratory tract infection and acute gastroenteritis - Goiânia, Goiás, Brazil. *Braz J Infect Dis* pii: S1413-8670(16)30475-5.

Sousa TT, Souza M, Fiaccadori FS, Borges AM, Costa PS, Cardoso Dd. 2012. Human bocavirus 1 and 3 infection in children with acute gastroenteritis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(6):800-4.

Saulsbury FT, Winkelstein JA, Yolken RH. 1980. Chronic rotavirus infection in immunodeficiency. *J Pediatr* 97(1):61-5.

Sumi A, Kobayashi N, Ohtomo N. 2005. Proportion of sporadic gastroenteritis cases caused Rotavirus, Norovirus, Adenovirus and Bacteria in Japan from January 2000 to December 2003. *Microbiol Immunol* 49(8):745-756.

Swathirajan CR, Vignesh R, Pradeep A, Solomon SS, Solomon S, Balakrishnan P. 2017. Occurrence of enteric parasitic infections among HIV-infected individuals and its relation to CD4 T-cell counts with a special emphasis on coccidian parasites at a tertiary care centre in South India. *Indian J Med Microbiol* 35(1):37-40.

Tan M, Hegde RS, Jiang X. 2004. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol* 78:6233-42.

Tan M, Xia M, Chen Y, Bu W, Hedge RS, Meller J, *et al.* 2009. Conservation of Carbohydrate Binding Interfaces-Evidence of Human HBGA Selection in Norovirus Evolution. *PLoS ONE* 4(4):e5058.doi:10.1371/journal.pone.0005058.

Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD. 2016. World Health Organization–Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. *Clin Infect Dis* 1(62) Suppl 2:S96-S105.

Tesfamariam K, Baraki N, Kedir H. 2016. Pre-ART nutritional status and its association with mortality in adult patients enrolled on ART at Fiche Hospital in North Shoa, Oromia region, Ethiopia: a retrospective cohort study. *BMC Res Notes* 9(1):512.

Thomas PD, Pollok RC, Gazzard BG. 1999. Enteric viral infections as a cause of diarrhoea in the acquired immunodeficiency syndrome. *HIV Med* 1(1):19-24.

Thornton AC, Jennings-Conklin K, Mccornick M. 2004. Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Manag Response* 2:4-9.

Tiemessen CT, Kidd AH. 1995. The subgroup F adenoviruses. *J Gen Virol* 76: 481-97.

Trevino M, Prieto E, Penalver D, Aguilera A, Garcia-Zabarte A, Garcia-Riestra C *et al.* 2001. Diarrhea caused by adenovirus and astrovirus in hospitalized immunodeficient patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 19:7-10.

Tse H, Lau SK, Chan WM, Choi GK, Woo PC, Yuen KY. 2012. Complete genome sequences of novel canine noroviruses in Hong Kong. *J Virol* 86:9531-9532.

Turcios R, Widdowson MA, Sulka A, Mead P, Glass R. 2006. Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: United States, 1998-2000. *Clin Infect Dis* 42:964-969.

Uhnoo I, Wadell G, Svensson L, Johansson ME. 1984. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol* 20:365–372.

UNICEF 2016. One is too many: Ending child deaths from pneumonia and diarrhea. [https://www.unicef.org/publications/index\\_93020.html](https://www.unicef.org/publications/index_93020.html). Acesso em: Maio de 2017.

Van Eijk AM, Brooks JT, Adcock PM, Garrett V, Eberhard M, Rosen DH, *et al.* 2010. Diarrhea in children less than two years of age with known HIV status in Kisumu, Kenya. *Int J Infect Dis* 14(3):e220-5.

Verma H, Chitambar SD, Gopalkrishna V. 2011. Circulation of Aichi virus genotype B strains in persons with acute gastroenteritis in India. *Epidemiol Infect* 139: 1687-91.

Verma H, Chitambar SD, Varanasi G. 2009. Identification and characterization of enteric adenoviruses in infants and children hospitalized for acute gastroenteritis. *J Med Virol* 81:60-64.

Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. 2007. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis* 13:636-637.

Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich MP. 2007a. Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 79(7):939-44.

Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JPG, Miagostovich MP. 2007b. Prevalence and Molecular Epidemiology of Noroviruses in Hospitalized Children With

Acute Gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *The Ped Infec Dis J* 26 (2):602-606.

Villamor E, Fataki MR, Bosch RJ, Mbise RL, Fawzi W. 2004. Human immunodeficiency virus infection, diarrheal disease and sociodemographic predictors of child growth. *Acta paediat* 93:372-379.

Vinje J. 2015. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 53(2): 373-81.

Vizzi E, Angulo Medina LA. 2013. Enteropathogens responsible for gastrointestinal disorders in HIV patients. *Invest Clin* 54(1):90-108. Review

Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, Ishii J, Sanekata T, *et al.* 2011. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. *Emerg Infect Dis* 17:1491-3.

Walter JE, Mitchell DK. 2003. Astrovirus infection in children. *Curr Opin Infect Dis* 16:247-253.

Weber R, Ledergerber B, Zbinden R 1999 Enteric infections and diarrhea in human immunodeficiency virus-infected persons: prospective community-based cohort study. Swiss HIV Cohort Study. *Arch intern Med* 159:1473-1480.

Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 9(4):247-262.

Wood DJ, Longhurst D, Killough RI, David TJ. 1988. One-year prospective cross-sectional study to assess the importance of group F adenovirus infections in children under 2 years admitted to hospital. *J Med Virol* 26: 429-435.

World Health Organization (WHO). 2011. Rotavirus surveillance worldwide – 2009. WHO Weekly Epidemiological Record 86:174-76.

Wunderl W, Meerbach A, Gungör T, Berger C, Greiner O, Caduff R, *et al.* 2011. Astrovirus infection in hospitalized infants with severe combined immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *PLoS One*. 2011; 6(11).

Xavier MP, Carvalho Costa FA, Rocha MS, Andrade JS, Diniz FK, Andrade TR, *et al.* 2015. Surveillance of Human Astrovirus Infection in Brazil: The First Report of MLB1 Astrovirus. *PLoS One* 14(8):e0135687.

Xavier MP, Oliveira SA, Ferreira MSR, Assis RM, Victoria M, Strina A, *et al.* 2009. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Research* 42:438-444.

Yamashita T, Kobayashi S, Sakae K, Nakata S, Chiba S, Ishihara Y *et al.* 1991. Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. *J Infect Dis* 164:954-957.

Yamashita T, Ito M, Tsuzuki H, Sakae K. 2001. Identification of Aichi virus infection by measurement of immunoglobulin responses in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 39(11): 4178-80.

Yamashita T, Sakae K, Ishihara Y, Isomura S, Utagawa E. 1993. Prevalence of newly isolated, cytopathic small round virus (Aichi strain) in Japan. *J Clin Microbiol* 31:2938–2943.

Yamashita T, Sakae K, Kobayashi S, Ishihara Y, Miyake T, Mubina A, *et al.* 1995. Isolation of cytopathic small round virus (Aichi virus) from Pakistani children and Japanese travelers from Southeast Asia. *Microbiol Immunol* 39: 433-435.

Yamashita T, Sakae K, Tsuzuki H, Suzuki Y, Ishikawa N, Takeda N, *et al.* 1998. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans. *J Virol* 72:8408-8412.

Yamashita T, Sugiyama M, Tsuzuki H, Sakae K, Suzuki Y, Miyazaki Y. 2000. Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the Picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. *J Clin Microbiol* 38:2955-2961.

Yang S, Zhang W, Shen Q, Yang Z, Zhu J, Cui L, Hua X. 2009. Aichi virus strains in children with gastroenteritis, China. *Emerg Infect Dis* 15:1703-1705.

Yu JM, Li DD, Xu ZQ, Cheng WX, Zhang Q, Li HY, *et al.* 2008. Human bocavirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in China. *J Clin Virol* 42(3):280-285.

Zhang DM, Ma MM, Wen WT, Zhu X, Xu L, He ZJ, *et al.* 2015. Clinical epidemiology and molecular profiling of human bocavirus in faecal samples from children with diarrhoea in Guangzhou, China. *Epidemiol Infect* 143(11):2315-29.

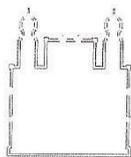
Zhao M, Zhu R, Qian Y, Deng J, Wang F, Sun Y, Dong H, Liu L, Jia L, Zhao L. 2014. Prevalence analysis of different human bocavirus genotypes in pediatric patients revealed intra-genotype recombination. *Infect Genet Evol* 27:382-8.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346:312-323.

Zhou T, Chen Y, Chen J, Hu P, Zheng T, Xu X, Pei X. 2017. Prevalence and clinical profile of human bocavirus in children with acute gastroenteritis in Chengdu, West China, 2012-2013. *J Med Virol* 15 doi:10.1002/jmv.24787.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz Fundação (FIOCRUZ) (311/2006)



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 15 de maio de 2006.

#### PARECER

**Título do Projeto:** "Detecção e Identificação de Vírus Responsáveis pela Etiologia da Gastroenterite Aguda"  
**Protocolo CEP:** 311/06  
**Pesquisador Responsável:** José Paulo Gagliardi Leite  
**Instituição:** IOC  
**Deliberação:** APROVADO

O estudo tem como objetivos detectar rotavírus A e C, astrovírus, calicivírus humanos e adenovírus entéricos, em amostras fecais de gastroenterite agudas, além de implementar metodologias para a detecção de outros vírus, associados a estas infecções, com caracterização molecular e análises genealógicas, na busca de variações geográficas e/ou temporais.

Segundo a Organização Panamericana de Saúde as gastroenterites agudas são, após as infecções respiratórias agudas, constituem o mais importante agravo à saúde em crianças menores de cinco anos. Associados ao quadro de desnutrição, estas são responsáveis por mais de 3,3 milhões de mortes no mundo, sendo que um milhão destas ocorre na América Latina. O trabalho pretende identificar outros vírus gastroentéricos causadores de doenças em nosso meio, objetivando a criação de um Programa de Vigilância Epidemiológica e Laboratorial de detecção e caracterização molecular (identificação) de vírus, no sentido de auxiliar a avaliação do impacto na introdução da vacina em nosso país.

Trata-se de um projeto integrado, envolvendo atividades de Graduação e Pós-Graduação.

Serão utilizadas fezes obtidas de amostras encaminhadas para diagnóstico e identificação viral que estão armazenadas no laboratório, onde a pesquisa será executada, ou enviadas pelos LACENs, ou unidades hospitalares.

O projeto não oferece nenhum risco físico aos participantes com referência à obtenção do material biológico para estudo.

O TCLE está claro, com as informações necessárias.

A equipe envolvida no estudo é qualificada para tal e o projeto será desenvolvido no Laboratório de Referência para Rotaviruses, do Depto. de Imunologia, do Instituto Oswaldo Cruz.

Após análise das respostas às pendências emitidas no parecer datado de 28/04/2006 por este colegiado, tendo por referência as normas e diretrizes da Resolução 196/96, foi decidido pela APROVAÇÃO do referido protocolo.

Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais/anuais e relatório final do projeto de pesquisa.

Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo original deverá ser submetida para apreciação do CEP/Fiocruz.

Alda Maria Da-Cruz  
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz

## 9.2 Termo de ciência do Hospital Jesus



### TERMO DE CIÊNCIA

Declaro estar ciente e de acordo com a realização da pesquisa intitulada "Caracterização do perfil etiológico das diarreias virais em crianças com HIV/AIDS em Centro de Referência no Rio de Janeiro", sob responsabilidade dos pesquisadores MsC Silvana Augusta Rodrigues Portes, Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa e Dr. Eduardo de Mello Volotão, do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Centro de Referência Regional para Rotavíruses, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

Declaro, também, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96 e suas complementares e com o Código de Ética Médica de 1988 (artigos 122 a 1307). Esta instituição está ciente se suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem estar.

Declaro ter lido e concordar com o parecer ético número 311/2006, emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ.

Rio de Janeiro, 27 de março de 2012.



---

Myrna Santos Rocha  
Chefia de Clínica Pediátrica

Hospital Municipal Jesus / Secretaria Municipal de Saúde / RJ (H. M. Jesus/SMS/RJ)



---

Ariane Molinaro Vaz de Souza  
Coordenadora Médica Assistencial

Hospital Municipal Jesus / Secretaria Municipal de Saúde / RJ (H. M. Jesus/RJ)