

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Mestrado em Medicina Tropical**

**DETECÇÃO DE VÍRUS GASTROENTÉRICOS E  
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ROTAVÍRUS  
EM CRIANÇAS HOSPITALIZADAS COM DIARRÉIA  
AGUDA E COMORBIDADES NA CIDADE DE MAPUTO,  
MOÇAMBIQUE**

**JORFÉLIA JOSÉ CHILAÚLE**

**Rio de Janeiro**

**2012**

Chilaule, Jorfelia Jose.

Detecção de vírus gastroentéricos e caracterização molecular dos rotavírus em crianças hospitalizadas com diarreia aguda e comorbidades na cidade de Maputo, Moçambique / Jorfelia Jose Chilaule. - Rio de Janeiro, 2012. xiv,105f f.; il.

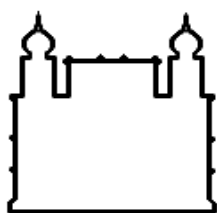
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2012.

Orientador: Filipe Anibal Carvalho-Costa.

Co-orientador: Ilesh Jani.

Bibliografia: f. 70-86

1. Vírus gastroentéricos. 2. Comorbidades. 3. Crianças hospitalizadas. 4. Moçambique. I. Título.



**Ministério da Saúde**  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL**

**Detecção de vírus gastroentéricos e caracterização molecular dos rotavírus em crianças hospitalizadas com diarreia aguda e comorbidades na cidade de Maputo, Moçambique**

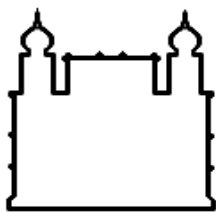
**Jorfélia José Chilaúle**

Dissertação apresentada a Coordenação de Pós-Graduação em medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre, área de concentração: diagnóstico, epidemiologia e controle de doenças infecciosas e parasitárias.

**Orientadores:** Dr. Filipe Aníbal Carvalho-Costa

Dr. Ilesh V. Jani

Rio de Janeiro, Outubro de 2012



**Ministério da Saúde**

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Mestrado em Medicina Tropical**

Jorfélia José Chilaúle

**DETECÇÃO DE VÍRUS GASTROENTÉRICOS E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DOS ROTAVÍRUS EM CRIANÇAS HOSPITALIZADAS COM  
DIARRÉIA AGUDA E COMORBIDADES NA CIDADE DE MAPUTO,  
MOÇAMBIQUE**

**ORIENTADORES:** Dr. Filipe Aníbal Carvalho-Costa

Dr. Ilesh V. Jani

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Dr. Eduardo de Mello Volotão (Presidente)

---

Dra. Caroline Cordeiro Soares

---

Dra. Mariana Aires

---

Dr. Hugo Reis Resque

---

Dra. Tatiana Lundgren Rose

Rio de Janeiro, Outubro de 2012

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, José Chilaúle (*in memoriam*) e Felismina Mangave, pela dedicação, pelos conselhos, educação, incentivo e por me tornarem a pessoa maravilhosa e amável que sou hoje; aos meus irmãos, Celso, Feldência, Adérito e Diolanda.

Ao meu namorado Eurico Braz Macuácuá, por estar sempre presente em todos momentos, pelo companheirismo, pelo incentivo, pelo respeito, pelo amor, pela força, por ter aceito e compreendido a minha ausência durante estes dois anos de mestrado.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradecer a Deus pela sua presença na minha vida e por iluminar todos os meus passos.

Ao Dr. Ilesh V. Jani, Director do Instituto Nacional de Saúde e Alda Maria da Cruz, então coordenadora da Pós-Graduação em Medicina Tropical no Instituto Oswaldo Cruz, pela oportunidade concedida em fazer o mestrado. Ao Dr. Ivo Paulo Garrido, então Ministro de Saúde de Moçambique pela confiança.

Aos meus orientadores, Dr. Filipe Aníbal Carvalho-Costa, Dr. Ilesh V. Jani e Dra. Nilsa de Deus, pela orientação valiosa, ensinamentos, apoio, força, estímulo e paciência, o que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, pelo mestrado; à coordenação da Pós-Graduação de Medicina Tropical e aos professores do curso pelos ensinamentos e sabedoria.

Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, chefe do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, por ter me recebido como estudante/estagiária e ter aceito a realização do trabalho laboratorial.

Ao Ministério de Saúde de Moçambique pelo suporte financeiro.

Ao Director do Hospital Geral de Mavalane, Dr. Ussene Isse, por ter concedido a autorização para coleta das amostras naquela unidade sanitária e à enfermeira Fátima pela ajuda incondicional na coleta das amostras.

Um obrigado especial às crianças e aos responsáveis pelas crianças que aceitaram participar no estudo.

A todos funcionários do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, pelos ensinamentos, pelo apoio técnico, pela ajuda incondicional durante o mestrado, pela amizade e pelos bons momentos de convivência, dentro e fora do laboratório.

A banca examinadora (Eduardo de Mello Volotão, Caroline Cordeiro Soares, Mariana Aires, Hugo Reis Resque e Tatiana Lundgren Rose) pela melhoria do trabalho e aprovação.

A toda equipe de Isolamento Viral do Instituto Nacional de Saúde de Moçambique, pelo apoio e companheirismo durante o mestrado e pela força no momento mais difícil da minha vida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este mestrado fosse um sucesso, prazeroso e divertido de fazer.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
CDC	<i>Centers of Diseases Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção das Doenças)
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNBS	Comitê Nacional de Bioética para Saúde de Moçambique
dATP	Desoxiadenina Trifosfato
dCTP	Desoxicitosina Trifosfato
dGTP	Desoxiguanina Trifosfato
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos
dTTP	Desoxitimina Trifosfato
EIE	Ensaio Imunoenzimático
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramma
GIVS	<i>Global Immunization Vision and Strategy</i>
HAstV	Astrovírus Humanos
HBGA	<i>Histo-blood group antigens</i> (antígeno do grupo histo-sanguíneo)
HGM	Hospital Geral de Mavalane
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IATA	<i>International Air Transport Association</i> (Associação Internacional do Transporte Aéreo)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (antígeno leucocitário humano)
IEM	<i>Immuno electron microscopy</i> (imunomicroscopia eletrônica)
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INS	Instituto Nacional de Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
kb	Quilobases



LVCA	Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental
mA	Miliamperes
ME	Microscópio Electrónico
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MHC	<i>Major Histocompatibiliy Complex</i> (Complexo principal de Histocompatibilidade)
MICS	<i>Multiple Indicator Chister Survey</i>
ml	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
nm	Nanômetros
NoV	Norovírus
ORF	<i>Open reading frame</i> (fase aberta de leitura)
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
P.A.	Para Análise
pb	Pares de bases
RIA	Radioimunoensaio
RNA	Ácido Ribinucléico
RNAfd	RNA de fita dupla
RNAfs	RNA de fita simples
rpm	Rotação por minuto
RpRd	RNA-polimerase RNA-dependente
RT-PCR	Reação em cadeia pela polimerase precedida da transcriptase reversa
RV	Rotavírus
RV-A	Rotavírus do grupo A
sgRNA	RNA subgenômico
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SRO	soro de re-hidratação oral
TBE	Tris/Borato/EDTA
Th	Células T helper
UNICEF	<i>United Nation Children's Fund</i> (Fundo das Nações Unidas para a Infância)
UI	Unidade infecciosas
US\$	Dólares americanos
VLP <sub>s</sub>	<i>Virus like-particles</i> (partículas tipo-vírus)
WHO/OMS	World Health Organization / Organização Mundial da Saúde

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura e proteínas de RV- A .....	3
Figura 1.2: Organização genômico dos NoV .....	4
Figura 1.3: Classificação de NoV em 5 genogrupos (GI - GV) e 32 genótipos.....	4
Figura 1.4: Relação filogenética dos gêneros da família <i>Astroviridae</i> .....	5
Figura 1.5: Organização do genoma dos HAsV.....	6
Figura 4.1: Fluxograma para detecção de RV, NoV e HAsV .....	33
Figura 5.1: Local de residência dos 123 casos de diarreia aguda estudados em Maputo..	45
Figura 5.2: Distribuição dos 123 casos de diarreia aguda estudados em Maputo por sexo .....	46
Figura 5.3: Distribuição dos 123 casos de diarreia aguda estudados em Maputo por faixa etária.....	47
Figura 5.4: Distribuição dos 123 casos de diarreia aguda estudados em Maputo por tipo de alimentação.....	49
Figura 5.5: Detecção de RV-A, NoV e HAsV na população estudada .....	49
Figura 5.6: Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de RV .....	50
Figura 5.7: Eletroforese em gel de agarose para detecção de NoV .....	50
Figura 5.8: Eletroforese em gel de agarose para detecção de HAsV .....	51
Figura 5.9: Número de casos de RV-A, NoV e HAsV com base na faixa etária.....	53
Figura 5.10: Eletroforese em gel de agarose para identificação de RV-A VP4.....	55
Figura 5.11: Eletroforese em gel de agarose para caracterização molecular da VP4.....	55
Figura 5.12: Eletroforese em gel de agarose para identificação de RV-A VP7 .....	56
Figura 5.13: Dendograma obtida a partir das análises das sequências nucleotídicas da VP7.....	57
Figura 5.14: Eletroforese em gel de agarose para detecção de NoV (GII).....	58
Figura 5.15: Eletroforese em gel de agarose para detecção de NoV (GI).....	59

## LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1: Reagentes e respectivos volumes usados para obtenção de geis separador e concentrador na detecção dos RV em PAGE.....	35
Quadro 4.2: Reagentes usados na obtenção de cDNA a partir do RNA extraído .....	36
Quadro 4.3: Reagentes utilizados na detecção de NoV por PCR a partir do cDNA.....	36
Quadro 4.4: Reagentes utilizados na genogrupagem de NoV em GII e GI.....	37
Quadro 4.5: Reagentes utilizados na detecção de HAsV por RT-PCR.....	38
Quadro 4.6: Reagentes utilizados na detecção de VP4 .....	38
Quadro 4.7: Reagentes utilizados na genotipagem de VP4 a partir do produto da primeira PCR .....	39
Quadro 4.8: Reagentes utilizados na detecção de VP7 .....	40
Quadro 4.9: Reagentes usados na reação de sequenciamento para genotipagem de VP7.41	
Quadro 4.10: Amostras protótipos de RV-A, utilizados nas análises filogenéticas obtidas no <i>GenBank</i> , com o respectivo número de acesso, país e espécie de origem .....	42
Quadro 4. 11: Sequência de iniciadores utilizadas na detecção de RV-A, NoV e HAsV	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1: Comorbidades associadas a casos de gastroenterite em crianças estudadas ..	47
Tabela 5.2: Sinais e sintomas observados nas crianças estudadas .....	48
Tabela 5.3: Distribuição das infecções por RV-A, Nov e HAstV com base no tipo de alimentação.....	52
Tabela 5.4: Sinais e sintomas observadas nas infecções por RV-A, Nov e HAstV na população estudada .....	52
Tabela 5.5: Distribuição das infecções por RV-A, NoV e HAstV com base na comorbidade .....	54
Tabela 5.6: Número de registro das amostras no LVCA, mês de coleta e os respectivos genótipos VP7 (G-tipo) e VP4 (P-tipo).....	54
Tabela 5.7: Percentagem de identidade nucleotídica* e aminoacídica* entre as sequências das amostras em estudo e os principais protótipos utilizados na análise .....	57

## ÍNDICE

DEDICATÓRIA .....	iii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE QUADROS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos históricos .....	1
1.2. Classificação e Morfologia Viral.....	2
1.3. Transmissão.....	6
1.4. Replicação Viral .....	7
1.5. Patogênese .....	10
1.6. Imunidade .....	12
1.7. Manifestações clínicas.....	16
1.8. Tratamento.....	18
1.9. Prevenção e Controle.....	19
1.10. Epidemiologia e Distribuição Geográfica .....	21
1.11. Diagnóstico.....	25
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivo Geral .....	29
3.2. Objetivos Específicos .....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. Descrição da área do estudo .....	30
4.2. Desenho do Estudo .....	30
4.3. Definição de caso de doença diarréica aguda.....	31
4.4. Coleta, transporte e conservação das amostras fecais .....	31
4.5. Considerações Éticas .....	32
4.6. Diagnóstico Laboratorial .....	32
4.6.1. Suspensão Fecal a 10%.....	33
4.6.2. Detecção de RV-A por ensaio imunoenzimático (EIE).....	33
4.6.3. Extração de ácidos nucleicos .....	33

4.6.4. Detecção de RV em electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	34
4.6.5. Reacção da transcriptase reversa para obtenção de cDNA.....	35
4.6.6. Detecção de NoV por reacção em cadeia da polimerase (PCR) a partir de cDNA	36
4.6.7. Genogrupagem de NoV (região D) .....	37
4.6.8. Detecção de HAstV por reacção em cadeia da polimerase (PCR) - One Step.....	37
4.6.9. Detecção e Caracterização Molecular de RV-A por RT-PCR .....	38
4.6.10. Sequenciamento de VP7 .....	40
4.6.11. Análise de sequências .....	41
4.7. Análise de Dados .....	44
5. RESULTADOS .....	45
5.1. Descrição das características demográficas.....	45
5.2. Detecção de RV, NoV e HAstV .....	49
5.3. Distribuição das infecções por RV-A, NoV e HAstV com base no tipo de alimentação.....	51
5.4. Sinais e sintomas associados às infecções por RV-A, NoV e HAstV .....	52
5.5. Distribuição das infecções por RV-A, NoV e HAstV com base na faixa etária ....	52
5.6. Distribuição das infecções por RV-A, NoV e HAstV com base na comorbidade ..	53
5.7. Genotipagem de RV-A .....	54
5.8. Análise de Sequências .....	56
5.9. Genogrupagem de NoV .....	58
6. DISCUSSÃO .....	60
7. CONCLUSÕES .....	68
8. PERSPECTIVAS .....	69
9. BIBLIOGRAFIA .....	70
ANEXOS .....	87
Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	87
Anexo 2: Formulário de Registo do Participante .....	90
Anexo 3: Aprovação ética .....	91

## RESUMO

As gastroenterites virais estão entre as mais importantes causas de morbidade e mortalidade em crianças com menos de cinco anos de idade, principalmente nos países em desenvolvimento. Este estudo teve como objetivos i) descrever a frequência de detecção de rotavírus do grupo A (RV-A), norovírus (NoV) e astrovírus humanos (HAstV); ii) caracterizar molecularmente os RV-A. Para tal, foram coletadas 123 amostras fecais de crianças no Hospital Geral de Mavalane, cidade de Maputo, Moçambique, entre novembro 2011 e fevereiro de 2012. Os testes laboratoriais foram realizados no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA). O RV-A foi detectada por electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e ensaio imunoenzimático (EIE), enquanto NoV e HAstV foram detectadas por RT-PCR. A caracterização molecular de G-tipo dos RV-A foi realizado pelo sequenciamento da VP7 e P-tipo através de *semi-nested* PCR multiplex. Todas crianças foram hospitalizadas com diarreia, entretanto, a maioria também apresentava outros quadros infecciosos (comorbidades), como a malária (23,6%), infecções respiratórias agudas (21,1%), HIV / SIDA (13,8%) e desnutrição protéico-calórica (30,1%). Os agentes virais foram detectados em 27 (22%) das crianças estudadas. RV-A, NoV e HAstV foram detectadas em 4 (3,3%), 13 (10,6%), e 10 (8,1%) crianças, respectivamente. Das treze amostras positivas para NoV, oito foram classificadas como sendo do genogrupo II (GII) e uma do genogrupo I (GI). Três amostras positivas para RV-A foram genotipadas, duas foram caracterizadas como G12P[6] e outra como G12P[8]. A alta frequência de comorbidades pode explicar a detecção relativamente baixa de agentes virais, especialmente RV-A. A presença de RV-A G12 em Moçambique ilustra a emergência deste genótipo, como observado em outros países. Este é o primeiro estudo que aborda a caracterização molecular de RV-A e a descrição da ocorrência de NoV e HAstV em Moçambique. Os resultados encontrados neste estudo demonstram a importância de se estabelecer uma vigilância ativa da síndrome diarreica no país.

## ABSTRACT

Viral gastroenteritis is considered one of the most important causes of morbidity and mortality in children under five years old, mainly in developing countries. This study aims to describe i) the frequency of rotavirus (RV-A), norovirus (NoV) and human astrovirus (AstV) and ii) molecular characterization of RV-A. Among 123 fecal samples of children hospitalized with diarrheal disease were collected at the Mavalane General Hospital, City of Maputo, Mozambique, between November 2011 and February 2012. Laboratory tests were performed at the Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA). RV-A was detected by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and EIE while NoV and HAstV were detected by RT-PCR. The molecular characterization of G-type RV-A was performed by sequencing the VP7 and p-type through semi-nested multiplex PCR. Most of the children also had other infectious conditions (comorbidities) such as malaria (23.6%), acute respiratory infection (21.1%), HIV (13.8%) and protein-caloric malnutrition (30.1%). Viral agents were detected in 27 (22%) of children. RV-A, NoV and HAstV were detected in 4 (3.3%), 13 (10.6%), and 10 (8.2%) children, respectively. Of the thirteen samples positive for norovirus, eight belonged to genogroup II (GII) and one genogroup I (GI). Three RV-A-positive samples could be genotyped, two were characterized as G12P[6] and one as G12P[8]. The high frequency of comorbid conditions may explain the relatively low detection rate of viral agents, especially RV-A. In this context, in the studied setting, hospitalization for diarrheal disease seems to be part of a more complex clinical picture, with the primary diagnosis of acute gastroenteritis being less common. The presence of RV-A G12 in Mozambique illustrates the emergence of this genotype, as observed in other countries. This is the first study of RV-A molecular characterization and description of occurrence of norovirus and astrovirus in Mozambique. The results found in this study demonstrate the importance of active surveillance in this country.



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Aspectos históricos

A diarreia aguda é uma das doenças mais comuns em crianças com menos de cinco anos de idade e uma das principais causas das 10,6 milhões de mortes que ocorrem anualmente em crianças (Bryce et al, 2005), sendo responsável por aproximadamente 19% das mortes, onde a maioria dessas (78%) ocorre nos países da África e do sudeste asiático (Bochi-Pinto et al, 2008).

A diarreia pode ser de origem infecciosa (causada por diferentes agentes etiológicos) ou não infecciosa. Dos agentes infecciosos relacionados com a gastroenterite destacam-se vírus, bactérias e parasitas. Dentre os vírus, os rotavírus (RV), norovírus (NoV), astrovírus humanos (HAstV) e adenovírus entéricos são considerados relevantes (Wilhermi et al, 2003; Silva et al, 2008).

O estabelecimento dos vírus como agentes etiológicos das gastroenterites foi um processo longo, dificultado pela natureza fastidiosa desses vírus gastroentéricos. Estudos em voluntários, realizados nas décadas 40 e 50 nos Estados Unidos e no Japão, desempenharam papel importante na associação dos vírus com gastroenterites. Nesses estudos observou-se que agentes filtráveis, infecciosos e não bacterianos podiam causar doença diarreica. Essa observação foi feita após a administração oral, em voluntários adultos, de filtrados de material fecal com resultado negativo para bactérias, derivados de indivíduos doentes e a consequente produção de doença nesses voluntários sadios (Gordon et al, 1947 e Fukumi et al, 1957).

Um avanço importante na identificação dos vírus como agente etiológico em casos de gastroenterites ocorreu em 1972, quando Kapikian e seus colaboradores, utilizando microscopia imunoelétrica (IEM), visualizaram pequenas partículas virais em fezes provenientes de um surto diarreico numa escola primária de Norwalk em Ohio nos Estados Unidos. Essas pequenas partículas virais foram denominadas de vírus Norwalk (Kapikian et al, 1972).

Em 1973, Bishop e colaboradores, na Austrália e Flewett e colaboradores, na Inglaterra, identificaram partículas virais medindo entre 67 e 87 nm em biópsia de células intestinais e em fezes de crianças hospitalizadas, respectivamente. Em 1974, este agente foi denominado de rotavírus (RV), devido ao seu aspecto de roda, quando observado no microscópio eletrônico de transmissão (Estes e Kapikian, 2007).

Mais tarde, Appleton e Higgins em 1975, num estudo realizado em amostras fecais provenientes de surtos de diarreia e vômito em uma maternidade da Inglaterra observaram, também por microscopia eletrônica, a presença de pequenas partículas virais sem nenhuma semelhança estrutural com as previamente identificadas, RV e NoV. No mesmo ano, Madeley e Cosgrove denominaram os pequenos vírus de astrovírus, devido à estrutura morfológica em forma de uma estrela com 5 ou 6 pontas (Mendez e Arias, 2007).

## **1.2. Classificação e Morfologia Viral**

### **1.2.1. Rotavírus**

Os RV pertencem a família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. A partícula viral não é envelopada, possui simetria icosaédrica e mede aproximadamente 75 nm de diâmetro. Possui um RNA de fita dupla (RNAfd) com 11 segmentos, sendo que cada segmento codifica uma única proteína, exceto o segmento 11 que codifica para as proteínas NSP5 e NSP6 (Estes e Kapikian, 2007). O perfil segmentado do genoma viral pode ser visualizado pela electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (Figura 1.1A). Seis dos segmentos genômicos de RNAfd codificam proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) e os outros codificam proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6). Os segmentos de RNAfd estão inseridos na core viral e cada segmento possui uma fase aberta de leitura (*open reading frame* - ORFs) que codifica os produtos protéicos. As partículas contêm sua própria RNA-polimerase RNA-dependente (RpRd), neste caso a VP1 (Estes e Kapikian, 2007; Greenberg e Estes, 2009).

O virion possui três camadas protéicas distintas: capsídeo externo, capsídeo interno e core (Figura 1.1B). No capsídeo externo encontram-se as proteínas estruturais VP4, codificada pelo segmento 4 e VP7 codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 dependendo da cepa. Estas proteínas, VP4 e VP7, induzem a produção de anticorpos neutralizantes e são a base de classificação binária dos genótipos virais. Assim, a glicoproteína VP7 (G-tipo) e a proteína sensível a proteólise VP4 (P-tipo) são usadas para classificar os RV-A (Greenberg e Estes, 2009).

O capsídeo interno é composto pela proteína estrutural VP6, codificada pelo segmento 6. Esta proteína é a mais abundante, e com base na antigenicidade desta e mobilidade electroforética dos segmentos genômicos foram determinados sete grupos (A, B, C, D, E, F, G) de rotavirus. Os grupos A, B e C ocorrem tanto em humanos como em animais e os grupos D, E, F e G foram identificados somente em animais (Estes e

Kapikian, 2007). No entanto, os rotavírus do grupo A (RV-A) são os mais importantes, por serem os principais responsáveis por episódios de diarreia aguda em crianças menores de 5 anos em todo mundo (Estes e Kapikian, 2007; Greenberg e Estes, 2009).

O *core* é a camada mais interna do vírion e envolve o RNAfd. É composto por 3 proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3, codificados pelos segmentos genômicos 1, 2 e 3, respectivamente (Estes e Kapikian, 2007; Greenberg e Estes, 2009).

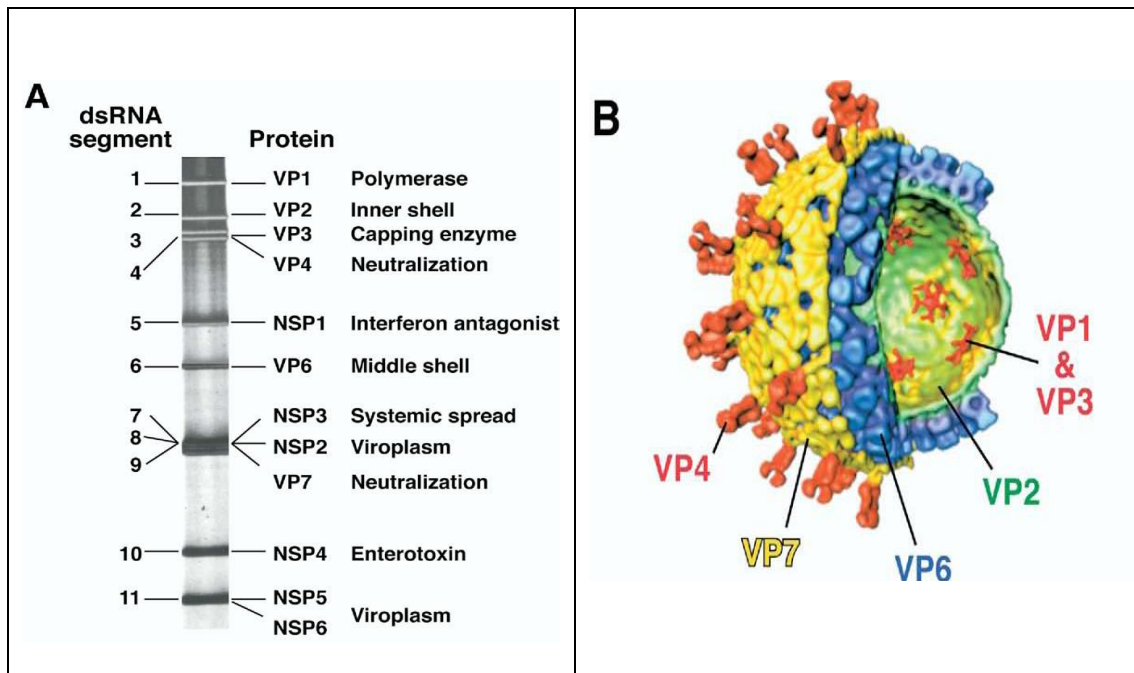


Figura 1.1: Estrutura e proteínas de RV- A. (A) Os 11 segmentos do genoma viral da RNAfd que são visualizado por PAGE; (B) Corte longitudinal da estrutura do RV-A mostrando as seis proteínas estruturais do RV-A (Estes e Greenberg, 2009).

### 1.2.2. Norovírus

Os NoV pertencem a família *Caliciviridae*, gênero *Norovirus*. A partícula viral não é envelopada, possui simetria icosaédrica e mede 38 - 40 nm de diâmetro. O genoma dos NoV é de aproximadamente 7,5 Kb com polaridade positiva formado por um RNA de fita simples (RNAfs) linear. Contém três fases abertas de leitura (ORFs) denominadas: ORF1, ORF2 e ORF3, que codificam tanto proteínas estruturais como não-estruturais (Green, 2007; Donaldson et al, 2010).

A ORF1 codifica uma poliproteína de aproximadamente 200 kD, que é auto-processada para produzir proteínas não estruturais, as replicases. A ORF2 e ORF3 produzem as proteínas estruturais VP1 e VP2, respectivamente. A VP1 é a componente

mais importante com 180 cópias encontradas na partícula viral intacta e a VP2 é a menor proteína estrutural (Figura 1.2) (Green, 2007; Donaldson et al, 2010).

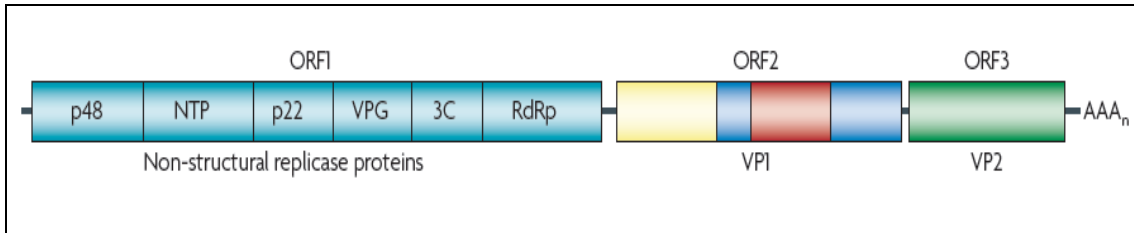


Figura 1.2: Organização genômico dos NoV (Donaldson et al, 2010).

Os NoV são classificados em 5 genogrupos (GI, GII, GIII, GIV, GV) e 32 genótipos baseados na diversidade da sequência da proteína VP1 completa (Figura 1.3) (Patel et al, 2009; Donaldson et al, 2010). Os genogrupos GI, GII e GIV infectam o homem, contudo, os genótipos mais relevantes para doença no homem pertencem aos genogrupos I e II (Patel et al, 2009; Donaldson et al, 2010).

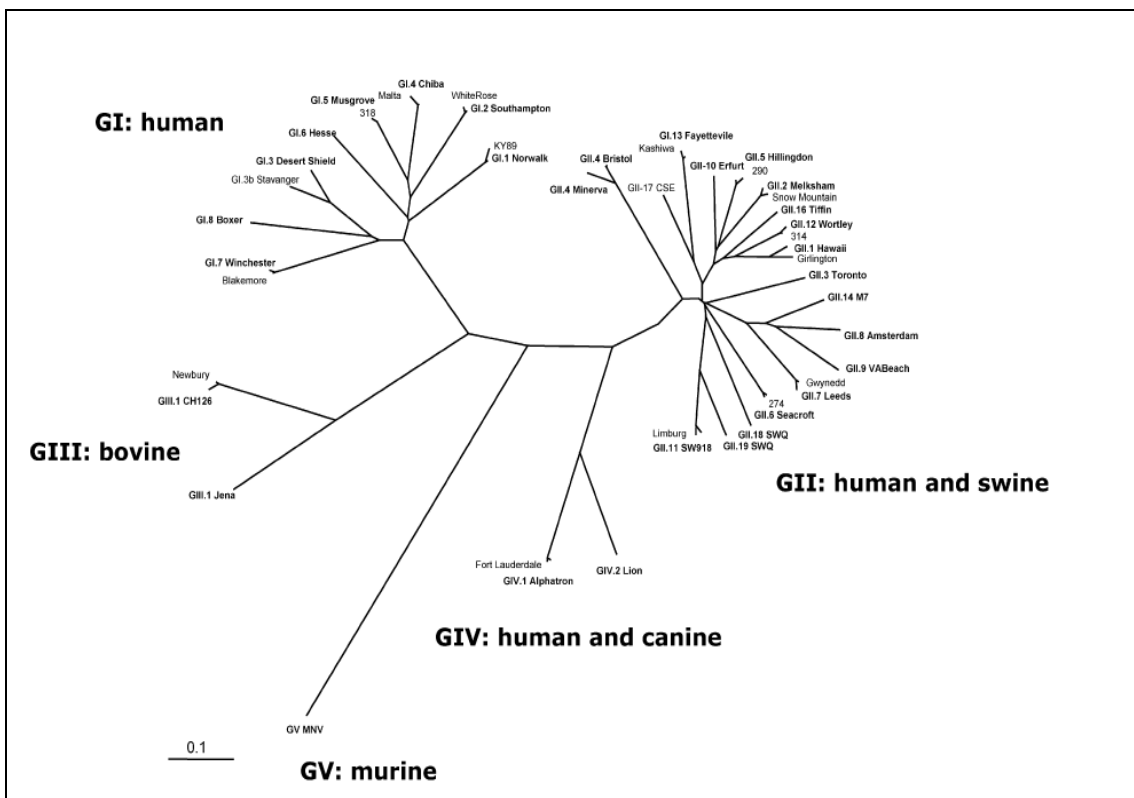


Figura 1.3: Classificação de NoV em 5 genogrupos (GI - GV) e 32 genótipos com base na diversidade da sequência de proteína VP1 (Patel et al, 2009).

### 1.2.3. Astrovírus

Os HAstV pertencem a família *Astroviridae*, que é composta por dois gêneros *Mamastrovirus* e *Avastrovirus*. Os HAstV que infectam o homem pertencem ao gênero *Mamastrovirus* e são divididos em 8 genótipos (HAstV-1, HAstV-2, HAstV-3, HAstV-4, HAstV-5, HAstV-6, HAstV-7, HAstV-8) com base na análise da sequência de uma região da ORF2 (Figura 1.4) (Wilhermi et al, 2003; Mendez e Arias, 2007).

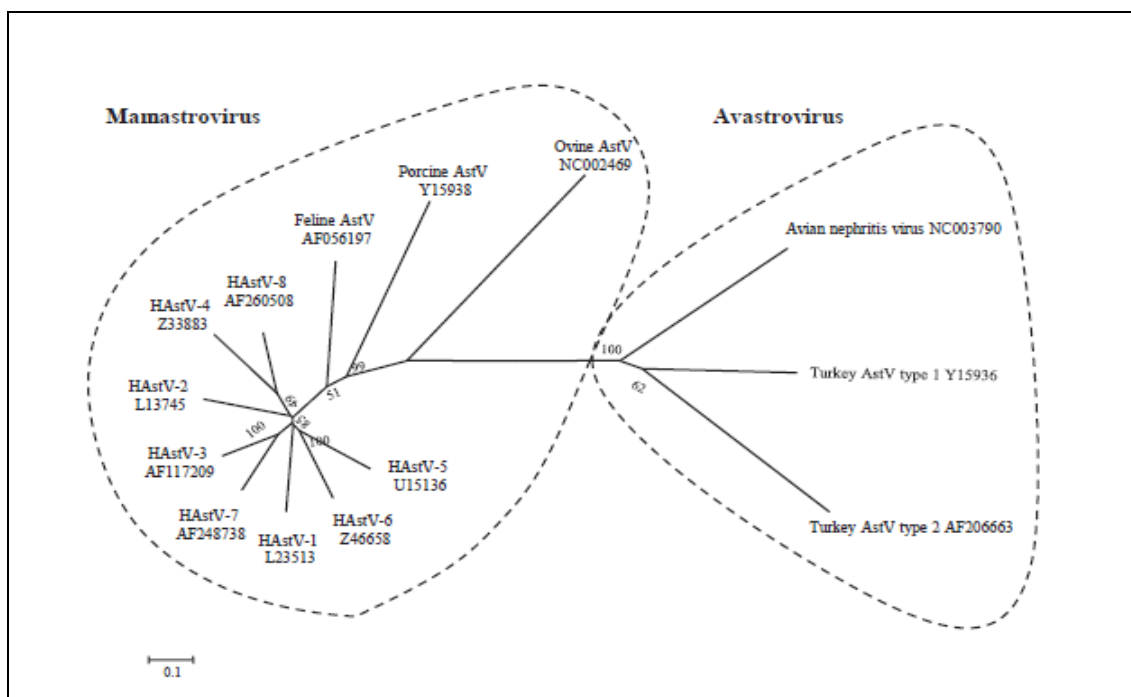


Figura 1.4: Relação filogenética dos gêneros da família *Astroviridae* com base na análise da sequência de uma região da ORF2 (Jeong et al, 2012).

A partícula viral não é envelopada, é esférica e mede entre 28 e 30 nm de diâmetro, possui um RNAs, polaridade positiva e uma morfologia em forma de estrela com 5 a 6 pontas (Mendez e Arias, 2007). O genoma dos HAstV é composto por três ORFs, denominadas: ORF1a, ORF1b e ORF2. As ORF1a e ORF1b estão localizados próximo à região 5' do genoma e codificam as proteínas não estruturais do virion, NSP1a e NSP1ab, respectivamente. A ORF2 localizada na terminação 3' do genoma, codifica as proteínas estruturais, que são sintetizadas como uma poliproteína precursora (Figura 1.5) (Mendez e Arias, 2007; Benedictis et al, 2011).

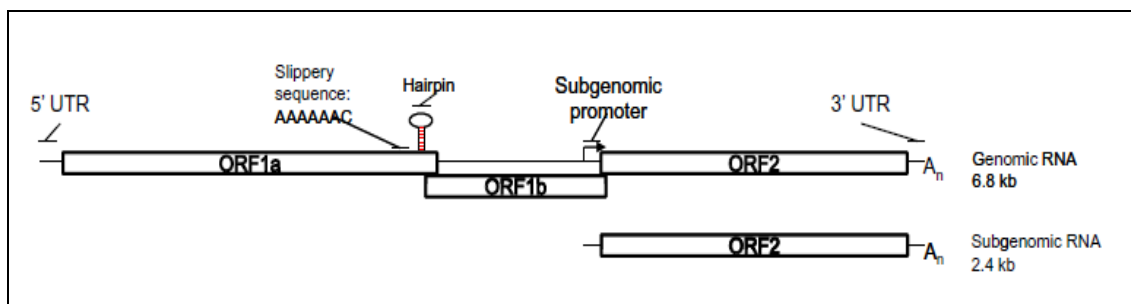


Figura 1.5: Organização do genoma dos HAstV (Benedictis et al, 2011).

### 1.3. Transmissão

#### 1.3.1. Rotavírus

Estudo realizado por Kapikian e colaboradores (1983), comprovou que os RV-A são transmitidos por via fecal-oral. Após administração oral de material fecal positiva para RV-A em voluntários adultos, 22% desenvolveram doença diarreica 2 - 4 dias após a administração e 67% desenvolveram evidências sorológicas da doença.

No entanto, há suposições segundo as quais os RV-A também podem ser transmitidos por via respiratória. Evidências para tais suposições baseam-se em alguns estudos realizados onde observou-se: (1) aquisição rápida de anticorpos contra o RV-A nos primeiros anos de vida, independentemente das normas de higiene; (2) a diarreia por RV-A ocorre principalmente nos meses frios e frequentemente está associada com sintomas respiratórios (Estes e Kapikian, 2007).

A duração média de excreção dos RV-A é de sete dias com uma variação de 4 - 29 dias após início da diarreia para detecção qualitativa por ensaio imunoenzimático (EIE), e de 4 - 57 dias, com uma média de 10 dias pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) (Richardson et al, 1998).

#### 1.3.2. Norovírus

A porta de entrada do NoV é a via fecal-oral, através de consumo de água e alimentos contaminados, do contacto pessoa-a-pessoa e por fômites infectados (Green, 2007). A infecção nosocomial também tem sido descrita (Sukhrie et al, 2012). Os níveis máximos de excreção de NoV ocorrem durante a fase aguda da doença que geralmente é de 1 - 3 dias, no entanto, a excreção do vírus nas fezes pode ser detectado por 4 semanas (em média) após a infecção, por reação de amplificação e quantificação do ácido nucléico em tempo real (*real-time* RT-PCR) (Atmar et al, 2008).

A excreção prolongada de vírus nas fezes e vômito, a estabilidade no ambiente e uma dose infecciosa baixa (18 partículas) facilitam a transmissão do vírus pessoa-a-pessoa (Teunis et al, 2008).

Evidências indiretas de estudos epidemiológicos sugerem que os NoV também podem ser transmitidos por aerossóis, através de jatos de vômito que ocorrem durante a fase aguda doença (Chadwick e McCann, 1994).

Devido à relativa estabilidade dos NoV no meio ambiente torna-se também possível a sua transmissão através do contacto com objetos contaminados (2012).

### 1.3.3. Astrovírus

A transmissão dos HAstV é por via fecal-oral como demonstrado nos estudos em voluntários humanos (Midthun et al, 1993); por fômites, consumo de água e alimentos contaminados. Surto em militares também já foram descritos demonstrando a transmissão do vírus pessoa-a-pessoa (Belliot et al, 1997).

Os HAstV já foram detectados em frutos do mar colectados em áreas poluídas por esgotos com efluentes de origem humana (Taylor et al, 2001). Além disso, estes vírus foram detectados em diferentes tipos de águas: águas dos rios, residuais, represas e em águas tratadas para o consumo (Mendez e Arias, 2007; Guimarães et al, 2008), sugerindo que os HAstV não são completamente eliminados após o tratamento convencional da água.

## 1.4. Replicação Viral

### 1.4.1. Rotavírus

A replicação dos RV-A ocorre após a adsorção do vírus às células epiteliais que revestem as vilosidades do intestino delgado. A princípio, o processo replicativo é limitado à mucosa intestinal (Greenberg e Estes, 2009).

Duas propriedades fundamentais dos RV-A, são apontadas como garantia do sucesso na replicação dos vírus: (1) o capsídeo triplo é muito estável, o que facilita a transmissão fecal-oral e distribuição dos vírus no intestino delgado onde infectam enterócitos maduros e (2) os enterócitos maduros expressam fatores necessários para infecção e replicação dos RV-A (Estes e Kapikian, 2007; Greenberg e Estes, 2009).

A ligação dos RV-A à célula hospedeira é através da proteína estrutural VP4 após a clivagem desta pela pepsina pancreática em VP5 e VP8. A VP5 interage e

promove a ligação com enterócitos humanos (Estes e Kapikian, 2007; Greenberg e Estes, 2009).

A penetração dos RV-A na célula hospedeira ocorre por dois mecanismos: (1) diretamente através da membrana plasmática, envolvendo a interação da VP4 e VP7 com as integrinas  $\alpha 2\beta 1$  e  $\alpha V\beta 3$ , e (2) através de um receptor que favorece a endocitose (Arias et al, 2002; Aoki et al, 2009).

Os RNA mensageiros (mRNAs) são transcritos de forma ordenada (inicialmente pelos segmentos menores e posteriormente pelos maiores) e as proteínas estruturais e não estruturais são traduzidas nos ribossomas (Greenberg e Estes, 2009).

A replicação viral e os estágios iniciais de montagem são restritos ao citoplasma da célula e ocorre dentro de uma estrutura especializada denominada viroplasma, localizada perto do retículo endoplasmático. Duas fitas recém-sintetizadas de RNA brotam do viroplasma para retículo endoplasmático num processo durante o qual as partículas adquirem um envelope transitório (Estes e Kapikian, 2007). Dentro do retículo endoplasmático o envelope transitório é removido e a VP7 é adicionada para completar a partícula viral num processo dependente de  $Ca^{2+}$  (Aoki et al, 2009; Greenberg e Estes, 2009). Partículas virais maduras são liberadas da célula por lise celular (Estes e Kapikian, 2007; Greenberg e Estes, 2009).

#### 1.4.2. Norovírus

A replicação primária do NoV não é bem conhecida mas acredita-se que ocorra no trato intestinal superior. Biópsias de jejuno de voluntários que desenvolveram a doença gastroentestinal depois da administração oral apresentaram lesões histopatológicas (Green, 2007).

Os NoV interagem com a célula hospedeira, provavelmente, através de um receptor específico do vírus, compostos por carboidratos (Kreutz et al, 1994; Donaldson et al, 2010). Estes carboidratos que funcionam como receptores são conhecidos como antígenos do grupo histo-sanguíneo (HBGA) (Tan et al, 2004). Após a interação ocorre a penetração e a consequente liberação do genoma viral no citoplasma (Kreutz et al, 1994; Green, 2007).

A tradução inicial após a entrada do genoma viral, provavelmente, é mediada pela interação do genoma ligado à proteína estrutural com a maquinaria de tradução celular (Gutierrez-Escolano et al, 2000). Primeiramente, ocorre a síntese da fita simples do RNA de cadeia negativa a partir do RNA genômico e em seguida é transcrito o RNA



genômico de partículas positivas, processo este que envolve a interação das proteínas celulares (Gutierrez-Escolano et al, 2003). O RNA genômico de cadeia positiva serve como molde para a síntese das proteínas estruturais VP1 e VP2 (Neill e Mengeling, 1998). A regulação da tradução de VP2 a partir de RNA subgenômico envolve um mecanismo de término ou reinício no qual sequências próximas de fim da região que codifica VP1 contém um sinal para a tradução da VP2 (Green, 2007). A fita negativa de RNA também serve como molde para transcrição das duas maiores espécies de fitas positivas de RNA correspondente a um comprimento genômico completo e subgenômico de RNA (Neill e Mengeling, 1998).

O empacotamento do RNA viral, a maturação e a liberação dos NoV necessitam ainda de maior entendimento. O genoma ligante de VPg e o subgenoma da fita positiva de RNA são encontradas em partículas de densidades diferentes, o que sugere que eles não são empacotados juntos no mesmo virião (Neill, 2002).

#### 1.4.3. Astrovírus

A replicação viral dos HAstV ainda não foi bem esclarecida. Estudos por microscopia eletrônica demonstraram que os HAstV se ligam preferencialmente por extensões celulares como estruturas similares a pseudópodes e microvilosidades (Mendez e Arias, 2007). Em indivíduos sintomáticos, partículas de HAstV foram detectadas no epitélio basal das vilosidades a partir de biópsia. A coloração por imunohistoquímica revelou o aumento progressivo dos HAstV no intestino delgado com uma infecção mais extensa no jejuno (Mendez e Arias, 2007).

Após a entrada dos HAstV na célula hospedeira, o RNA genômico é utilizado como molde para sintetizar as proteínas virais não estruturais (Mendez e Arias, 2007). A ORF1a codifica uma proteína não estrutural NSP1a; a ORF1b codifica a proteína não estrutural RpRd enquanto que a proteína não estrutural NSP1ab é derivada de ambos ORF1a e ORF1b, através do mecanismo de tradução de *frameshift* (Mendez e Arias, 2007; Jeong et al, 2012). As proteínas estruturais dos HAstV, codificadas na ORF2, são traduzidas a partir do RNA subgenômico (sgRNA) como uma poliproteína precursora de 87 - 90 kD, que é subsequentemente processada em três polipeptídeos que formam o capsídeo viral (Mendez e Arias, 2007; Jeong et al, 2012). O produto da primeira proteína codificada pela ORF2 é observado com abundância 12 horas após a infecção, enquanto que as proteínas não estruturais são inicialmente detectadas seis horas após a

infecção, somente por immunoensaios usando anticorpos específicos (Willcocks et al, 1999; Guix et al, 2004).

## **1.5. Patogênese**

### **1.5.1. Rotavírus**

A virulência do RV-A tem sido associada aos segmentos 3, 4, 5, 9 e 10. O segmento 3 codifica a VP3 (*capping enzyme*) que atua nos níveis de replicação viral; os segmentos 4 e 9 codificam as proteínas de capsídeo externos necessárias para o início da infecção; o segmento 5 codifica a proteína NSP1 que funciona como um antagonista de interferon e o segmento 10 codifica a proteína NSP4 que funciona na regulação homeostática de cálcio, replicação viral e também como uma enterotoxina (Estes e Kapikian, 2007; Greenberg e Estes, 2009).

A diarreia é a principal manifestação clínica de infecção por RV-A em crianças. A principal diferença na diarreia induzida por vírus e aquela induzida por bactérias é a inflamação/descamação observada nas células infectadas (Estes e Kapikian, 2007; Greenberg e Estes, 2009).

A compreensão da patogênese da doença é baseada principalmente em estudos de modelo animal. A patogênese é multifactorial e a diarreia malabsortiva ocorre devido à destruição e à descamação dos enterócitos, desregulação das enzimas absorptivas mediada pelo vírus e devido às mudanças funcionais nas junções entre os enterócitos, o que leva a perda dos eletrólitos (Greenberg e Estes, 2009).

Acredita-se que exista um componente secretor da diarreia por RV-A mediado pela ativação do sistema nervoso entérico e pelos efeitos da NSP4, que inicialmente foi descrita como uma enterotoxina. O estudo dos efeitos da NSP4 em cultura de células e em modelos animais sugeriu que a diarreia induzida por RV-A resulta, em parte, pela ativação dos canais  $Cl^-$  o que aumenta a secreção do  $Cl^-$  e conseqüentemente diarreia osmótica (Greenberg e Estes, 2009). Adicionalmente, alterações vasculares levam a isquemia vascular e alterações na motilidade intestinal (Estes e Kapikian, 2007). Alterações na motilidade intestinal também têm sido relatadas em alguns modelos animais, mas o seu papel em crianças continua pouco estudado (Greenberg e Estes, 2009).

A infecção por RV-A não se limita apenas ao intestino. Sua disseminação extra intestinal foi documentada a mais de 45 anos em camundongos onde foi detectado em múltiplos órgãos (Greenberg e Estes, 2009).

Pager e colaboradores (2000) detectaram por PCR, material genético do RV-A no líquido cefaloraquidiano de um neonato falecido. Um estudo de caso de uma criança com dois anos de idade hospitalizada com quadro de gastroenterite aguda, que evoluiu para óbito, teve achados histopatológicos compatíveis com miocardite e pneumonia associadas a RV-A Grech e colaboradores (2001).

Segundo Ramig (2007), antígenos virais e vírus infecciosos entram na circulação em crianças e em sistemas de modelos animais e Kobayashi e colaboradores (2010), também relataram caso de encefalite causada por RV-A em duas crianças com 2 e 3 anos de idade.

O uso de modelos animais e estudos decritos acima estão a fornecer evidências biológicas e moleculares da infecção por RV-A, em locais periféricos, o que sugere a infecção em outros órgãos.

#### 1.5.2. Norovírus

Devido à falta de modelo animal e à incapacidade de cultivar o NoV em linhagens celulares conhecidas, a maior parte dos dados de patogenia e imunologia foram obtidos a partir de estudos em voluntários humanos. Na fase aguda da doença, a mucosa intestinal desses voluntários apresentou anormalidades como achatamento e alargamento das vilosidades do intestino delgado, desorganização das células epiteliais e infiltração da lâmina própria por células mononucleares. A microscopia eletrônica mostrou mudanças nas células epiteliais do jejuno dos indivíduos doentes, notou-se uma dilatação do retículo endoplasmática liso e rugoso, com concomitante aumento no número dos corpos multivesiculares (Schreiber et al, 1974; Green, 2007).

Sugere-se que o genótipo do hospedeiro seja um factor importante no desenvolvimento da infecção por NoV uma vez que o NoV depende da presença de receptores do antígeno do grupo histo-sanguíneo (HBGA) no intestino do hospedeiro susceptível (Lindesmith et al, 2003; Tan et al, 2004).

Num estudo realizado por Wyatt e colaboradores (1974), no qual voluntários humanos foram administrados com NoV, apenas 50% desenvolveram a doença e 13 - 40% não foram infectados (não desenvolveram sintomas nem anticorpos contra NoV). Mais tarde, observou-se que os voluntários sintomáticos desenvolveram imunidade após administração, no entanto, essa imunidade teve curta duração (6 - 14 semanas), sugerindo que estes indivíduos podiam adquirir a doença quando re-infectados 2 - 3 anos mais tarde com mesmo inóculo (Wyatt et al, 1974; Parrino et al, 1977). No

entanto, estudos nestes indivíduos e a curta duração dos sintomas em relação a idade na coorte estudada, sugere o desenvolvimento de, pelo menos, protecção parcial contra NoV (Jonhson et al, 1990).

A susceptibilidade do hospedeiro pode explicar: (1) o por que pessoas com níveis elevados de anticorpos pré-existentes para NoV são propensas a desenvolver doenças após uma nova administração de NoV e (2) por que pessoas sem anticorpos para uma estirpe particular de NoV, após a administração, não são infectados.

### 1.5.3. Astrovírus

Apesar do impacto do HAstV na saúde pública, pouco se sabe sobre a sua patogênese. Acredita-se que uma das razões para isso seja a falta de um modelo animal adequado para infecção (Moser e Schultz-Cherry, 2005).

Sabire e colaboradores (2004), num estudo de caso de uma criança de 4 anos de idade com diarreia por HAstV que havia feito transplante de medula óssea, mostraram que a infecção por HAstV é limitada ao intestino delgado, também observaram irregularidade das células epiteliais superficiais e aumento das células inflamatórias da lâmina própria. A coloração imuno-histoquímica com anticorpos monoclonais específicos demonstrou coloração mais extensa em biópsias do duodeno e jejuno, predominantemente restrita na superfície laminal e no citoplasma das células epiteliais, mais acentuada nas extremidades das vilosidades. O exame de microscopia electrónica demonstrou partículas virais no citoplasma dos enterócitos, formando arranjos paracristalinos (Sabire et al, 2004; Mendez e Arial, 2007). No entanto, estudos em voluntários humanos não demonstraram alterações histológicas associadas à infecção por HAstV (Mendez e Arial, 2007).

## 1.6. Imunidade

### 1.6.1. Rotavírus

Os mecanismos responsáveis pela imunidade à infecção por RV-A ainda não são completamente entendidos, principalmente nos seres humanos, onde estudos sobre o papel dos anticorpos séricos têm levado a resultados contraditórios, alguns estudos mostram um efeito protector contra RV-A e outros não mostram essa relação. No entanto, os anticorpos têm demonstrado seu papel na imunidade local e sistêmica em modelos animais (Franco e Greenberg, 2001).

Estudos recentes têm demonstrado a importância da resposta imune inata e do interferon (IFN) na regulação da imunidade à RV-A. Wang e colaboradores (2007), observaram que os níveis de IFN tipo I e II aumentaram em crianças e em modelos animais infectados por RV-A. Os IFN tipo I e II são capazes de limitar a infecção por RV-A *in vitro* e a administração de IFN  $\alpha$  reduziu a diarreia associada à RV-A em bovinos e suínos (Schewers et al, 1985; Lecce et al, 1990). A imunidade inata tem um papel fundamental na proteção contra RV-A *in vitro* e em modelos animais, no entanto, o seu papel nos seres humanos ainda é pouco estudado (Estes e Greengard, 2009).

Informações relativas à imunidade humana na infecção por RV-A foram obtidas num estudo em voluntários, no qual 18 indivíduos foram administrados oralmente com G1. Neste estudo, observou-se que quatro dos cinco indivíduos que excretaram o vírus, desenvolveram doença diarreica. E ainda notou-se que voluntários com elevados níveis de atividade neutralizante, maior que 1:100, no fluido intestinal para vírus homotípico tendem a desenvolver menos doença diarreica do que aqueles com níveis mais baixas (Kapikian et al, 1983).

Em estudos relacionados, anticorpos intestinais IgA e da saliva foram medidas por ELISA. Níveis séricos de IgA contra RV-A demonstraram uma correlação com resistência à doença grave por RV-A (Hjeit et al, 1987). Um estudo realizado na Austrália demonstrou uma correlação forte entre níveis de anticorpos intestinais IgA e um grau significativo de proteção contra infecção natural e doença por RV-A em crianças (Coulson et al, 1992).

Matson e colaboradores (1993) e O’Ryan e colaboradores (1994), estudaram o papel dos anticorpos IgA e IgG na proteção contra infecção por RV-A em 100 e 63 crianças, respectivamente, com menos de 18 meses nos Estados Unidos, onde concluíram que: (1) os títulos de IgA fecais específicos a RV-A, superiores a 1:80 ou 1:20, estão correlacionados com proteção contra a infecção e doença por RV-A, respectivamente; (2) a pré-existência de anticorpos séricos IgA com títulos maiores que 1:200 ou IgG maior que 1:800 está associada com proteção à infecção e (3) altos níveis de pré-existência de anticorpos específicos para G-tipo estão associados à proteção contra a infecção.

O efeito protector da infecção neonatal contra infecções subsequentes por RV-A foi avaliado na Austrália por Bishop e colaboradores (1983) em 81 crianças acompanhadas durante um período de três anos, das quais 44 tiveram infecção neonatal

e 37 não tiveram. A frequência de infecção por RV-A durante o período de acompanhamento foi similar para os dois grupos, no entanto, os sintomas foram mais leves e a doença menos grave no grupo que teve exposição neonatal, sugerindo que a infecção neonatal por RV-A não confere imunidade mas protege contra o desenvolvimento das manifestações clínicas graves da doença durante a re-infecção.

Estudos sugerem que a imunidade homotípica é induzida após a ocorrência de 1ª infecção natural ou pela vacina contra RV-A e esta é mediada por anticorpos para VP7 e VP4 (Estes e Kapikian, 2007). O papel da imunidade mediada por células na resposta imune à infecção tem sido estudado tanto em humanos como em modelos animais. Esses estudos têm demonstrado que: (1) os anticorpos específicos contra RV-A têm importância primordial na proteção contra re-infecção por RV-A; (2) após a infecção primária, as células TCD8<sup>+</sup> induzem uma proteção completa em até duas semanas ou uma proteção parcial por mais ou menos três meses, no entanto, esta proteção diminui após um período de oito meses; (3) as células TCD8<sup>+</sup> expressam marcadores muito eficientes e importantes no *clearance* viral (Estes e Kapikian, 2007).

#### 1.6.2. Norovírus

A imunidade aos NoV em seres humanos ainda não está bem esclarecida. Os adultos demonstram um elevado grau de susceptibilidade à doença por NoV tanto por uma infecção natural assim como induzida experimentalmente. Em alguns surtos causados por NoV, mais de 80% dos adultos ficaram doentes (Kaplan et al, 1982). Além disso, aproximadamente 50% dos voluntários adultos desenvolveram doença após a administração de NoV (Green, 2007).

Devido a dificuldade de cultivar o vírus, muita informação sobre imunidade dos NoV foi obtida através de estudo com voluntários. Estudos em voluntários sugerem que existe duas formas de imunidade para NoV, uma imunidade de curta e outra de longa duração. A imunidade de curta duração sugere uma imunidade específica (sorotipo-específica), assim, voluntários que adquiriram infecção após a primeira administração de NoV foram resistentes à re-exposição ao mesmo vírus 6 - 14 dias depois (Parrino et al, 1977).

Para comprovar a imunidade de longa duração, 12 voluntários foram administrados com NoV em dois momentos diferentes, com um intervalo de 27 - 42 meses e estes exibiram dois padrões diferentes de resistência (Parrino et al, 1977). Seis dos 12 voluntários desenvolveram a doença gastroentérica após a primeira e segunda

administração, em contraste, os outros seis voluntários, não desenvolveram doença tanto na primeira quanto na segunda (feita 31 - 34 meses depois). Estudos serológicos, que consistiram na medição de anticorpos séricos de 12 voluntários após a primeira administração, com uso de microscopia imunoelectrônica (IEM) e radioimunoensaio (RIA), não forneceram uma explicação para a diferença da susceptibilidade nos dois grupos (Parrino et al, 1977; Cukor et al, 1982). Paradoxalmente, os voluntários que não ficaram doentes tiveram poucos, se não nenhum, anticorpos contra NoV mensuráveis pela IEM (Parrino et al, 1977).

Acredita-se que a imunidade adquirida pode desempenhar um papel importante no controle da infecção ao nível da mucosa. Lindesmith e colaboradores (2003), durante um estudo de caso, mostraram que o desenvolvimento de uma resposta rápida de IgA da mucosa (indicando uma exposição prévia ao NoV) foi associado com a resistência à doença após a administração de NoV.

A resposta imune mediada por células também foi estudada em voluntários após imunização oral com Norwalk VLP's. As VLP's induziram a resposta imune mediada por células para vírus específico e houve aumento de IFN na ausência de produção de IL-4, sugerindo Th-1 como via de produção de citocinas (Green, 2007).

### 1.6.3. Astrovírus

Os factores determinantes da imunidade a HAstV ainda não são bem compreendidos. A infecção sintomática é encontrada principalmente em dois grupos etários: crianças com menos de cinco anos e idosos (Mendez e Arias, 2007).

Evidências indiretas sugerem que o sistema imune desempenha um papel importante no controle da infecção contra HAstV. Estudos de biópsias do intestino humano sugerem que a imunidade celular, especificamente as células TCD4<sup>+</sup> estão envolvidas na resposta contra HAstV (Mendez e Arias, 2007). Além disso, vários modelos animais indicaram papel potencial do sistema imune inato no controle da infecção. A existência de sorotipos de HAstV em diferentes espécies, classificadas com base na reactividade dos anticorpos neutralizantes, sugere que os anticorpos exercem pressão imune sobre o vírus (Koci, 2005; Mendez e Arias, 2007).

A distribuição etária bimodal da infecção sintomática sugere que os anticorpos adquiridos nos primeiros anos de vida fornecem algum tipo de protecção contra a doença durante a maior parte da vida adulta e que a imunidade para HAstV diminui com a idade (Mendez e Arias, 2007).

Um estudo de caso que consistiu em terapia com imunoglobulina em um paciente imunocomprometido de 78 anos, com infecção persistente por HAstV, resultou no *clearance* viral e no fim da diarreia (Bjorkholm et al, 1995). No entanto, o papel dos anticorpos específicos para HAstV no *clearance* viral não foi definido uma vez que não houve medição dos anticorpos neutralizantes nas imunoglobulinas utilizadas na terapia, além disso, pacientes com transplante de medula óssea e com diarreia crônica não responderam ao tratamento com imunoglobulinas, embora tenha sido demonstrado a presença de anticorpos homólogos para sorotipos de HAstV nas imunoglobulinas (Cubitt et al, 1999). Assim, a resposta do paciente ao tratamento com imunoglobulinas que culminou com o *clearance* viral, pode ter sido causada por fatores adicionais e não necessariamente por anticorpos específicos contra os HAstV (Mendez e Arias, 2007).

O sistema imune da mucosa pode ser importante no controle da infecção secundária. As células TCD4<sup>+</sup>, que reconhecem os antígenos dos HAstV restritas ao antígeno leucocitário humano (HLA), foram encontradas na lâmina própria do intestino de adultos saudáveis (Molberg et al, 1998). Estas células TCD4<sup>+</sup> específicas para HAstV humanos, produzem células T subtipo 1 (T<sub>H</sub> 1), citocinas, interferon  $\gamma$  e fator de necrose tumoral, quando ativados (Molberg et al, 1998; Mendez e Arias, 2007), demonstrando deste modo o papel do sistema imune celular na infecção pelo HAstV.

## **1.7. Manifestações clínicas**

As manifestações clínicas observadas na infecção por vírus gastroentéricos não se diferem daquelas causadas por bactérias. De uma forma geral, a diarreia e vômito variam de 1 a 7 dias mas as vezes podem ser prolongados ou persistentes (Wilhermi et al, 2003).

### **1.7.1. Rotavirus**

A infecção por RV-A produz uma resposta que varia de subclínica, passando por diarreia leve, diarreia grave e mesmo doença fatal por desidratação.

Rodriguez e colaboradores (1977), compararam as manifestações clínicas de 150 pacientes hospitalizados com diarreia, sendo que 78 eram positivos para RV-A e 72 negativos. Nesse estudo eles observaram que: (1) os dois grupos tiveram febre acima de 37,9°C; (2) o grupo positivo para RV-A teve mais vômito e desidratação comparativamente ao grupo negativo; (3) a diferença na duração média da diarreia e de



vômito foi estatisticamente significativa ( $p < 0.01$ ) tendo sido maior no grupo positivo para RV-A.

Durante um período de cinco anos, Carlson e colaboradores (1978) observaram que a gastroenterite por RV-A foi responsável por 21 óbitos em crianças com idade entre 4 - 30 meses num hospital em Toronto. As mortes ocorreram dentro de três dias após o início dos sintomas, a acredita-se que a principal causa tenha sido a desidratação e desequilíbrio electrolítico em 16 pacientes e vômito em três.

Geralmente, a diarréia por RV-A tem uma duração média de sete dias, todavia, em crianças imunodeficientes, a infecção pode levar a uma doença grave e crônica associada à excreção prolongada de RV-A (Estes e Kapikian, 2007).

### 1.7.2. Norovírus

A infecção induzida por NoV pode ser assintomática ou grave, necessitando de intervenção médica.

Em 38 surtos associados a NoV observou-se as seguintes manifestações clínicas: náuseas 79%, vômitos 69%, diarréia 66%, febre 37%, dores abdominais 30%, mialgia 26%, cefaleia 22% e dor de garganta 18% (Kaplan et al, 1982).

Em crianças, o vômito ocorreu com mais frequência do que a diarréia e nos adultos têm se observado o contrário. A duração da doença em 28 surtos, variou de duas horas a vários dias com uma média de 12 - 60 horas. Em seis surtos a doença durou mais de três dias em mais de 15% de indivíduos infectados (Kaplan et al, 1982).

Dolin e colaboradores (1971), administraram NoV a dois voluntários humanos. Embora os dois voluntários tenham recebido o mesmo inóculo, um desenvolveu uma doença caracterizada por vômitos sem diarréia enquanto o outro apresentou diarréia sem vômito, sugerindo que o espectro clínico pode variar de um indivíduo para o outro.

Num outro estudo realizado por Whatt e colaboradores (1974), no qual 31 voluntários foram infectados experimentalmente, observou-se as seguintes manifestações clínicas: diarréia 81%, dor abdominal 68%, vômitos 65% e mialgia 58%.

Num outro estudo em 16 voluntários infectados por NoV observou-se que 14 dos 16 desenvolveram linfopenia (Dolin et al, 1976). Isso pode estar associado à migração dos linfócitos circulantes ao local da infecção no intestino delgado. Normalmente, os linfócitos remanescentes na circulação apresentaram uma resposta exacerbada a estímulo mitogênico (Dolin et al, 1976).

### 1.7.3. Astrovírus

As manifestações clínicas associadas ao HAstV podem variar dependendo da população em estudo.

Estudo realizado na Argentina em crianças com menos de 36 meses de idade demonstrou que o HAstV esteve associado com 12,4% dos casos de diarreia, 41,6% de febre e que 16,66% dos pacientes precisaram ser internados (Giordano et al, 2004).

Uma coorte realizada no Egito em 397 crianças com menos de 3 anos de idade demonstrou que: (1) a incidência da diarreia por HAstV foi a mesma daquela causada por RV-A e (2) a infecção por HAstV esteve associada com desidratação grave em 17% dos casos (Naficy et al, 2000).

Estudo em humanos mostrou que a diarreia persistente causada por HAstV em crianças tem sido associada a cepas pertencentes ao sorotipo 3 (Cabarello et al, 2003). Infecções experimentais em adultos evidenciaram que a maioria tem infecção assintomática e os poucos que desenvolvem a doença tiveram uma infecção autolimitada, com uma recuperação sem sequelas (Kurtz et al, 1979).

Vários estudos têm mostrado o HAstV como causa de diarreia crônica em crianças e adultos imunocomprometidos. Este agente já foi associado a surtos em enfermarias pediátricas com crianças HIV-positivas ou com transplante de medula óssea. Tem sido frequentemente detectado em pacientes com HIV e em pacientes com doenças auto-imunes como imunodeficiência das células T, leucemia, poli-endocrinopatias, pacientes receptores de transplantes e pacientes tratados com fludarabine (Mendez e Arial, 2007).

## 1.8. Tratamento

Não existe tratamento quimioterápico específico para diarreias causadas por RV-A, NoV ou HAstV. O tratamento é baseado na reposição de líquidos e electrólitos por via oral ou parental, para prevenção ou correção de desidratação (WHO, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a classificação dos casos de diarreia aguda em três categorias: (1) ausência de desidratação, neste caso o tratamento consiste na administração domiciliar de soro de re-hidratação oral (SRO) para prevenção da desidratação; (2) presença de desidratação leve, o tratamento consiste na administração SRO com a criança hospitalizada; (3) presença de desidratação grave na qual o tratamento consiste na hidratação venosa e na reposição de electrólitos.

## 1.9. Prevenção e Controle

### 1.9.1. Rotavírus

Devido ao fato de o RV-A afetar todas as crianças, independente das condições sociais, sugere-se que, ao contrário de muitos enteropatógenos de transmissão fecal-oral, o RV-A não seja passível de controlar-se através da melhoria das condições sanitárias da população. Por esta razão, a vacina é apontada como sendo a principal forma de prevenção contra os RV-A (Glass et al, 2006).

As tentativas de desenvolver uma vacina contra RV-A começaram nos anos 1980 e, de lá pra cá, muitos candidatos a vacina foram propostos.

Com objetivo de avaliar a eficácia da vacina, Vesikari e colaboradores (1984), administraram a cepa de RV bovino RIT 4237 em 86 crianças com idade entre 8 - 11 meses num estudo de caso-controle onde o grupo controle era composto por 92 crianças. Nesse estudo, observou-se uma eficácia de 88% na protecção contra diarreia grave e 50% para diarreia aguda, no entanto essa vacina foi menos eficaz em ensaios clínicos realizados em crianças da Gâmbia (33%) e do Peru (40%). Devido ao seu fracasso em ensaios clínicos realizados na África, o candidato a vacina RIT 4237 não prosseguiu (Estes & Kapikian, 2009).

Rotashield (RRT-TV), uma vacina tetravalente contendo os antígenos virais (cepas que infectam humanos) G1, G2, G4 e uma cepa original de macacos genótipo G3, foi desenvolvida no *National Institutes of Health* (Wyeth, Madison, NJ) (Greenberg e Estes, 2009). Após vários estudos para avaliar a segurança e a eficácia da vacina, observou-se que esta foi altamente eficaz (80 - 100%) na prevenção de doença diarreica grave (Greenberg e Estes, 2009), sendo licenciada em agosto de 1998. Seu uso foi recomendado em três doses, aos dois, quatro e seis meses de idade (Estes e Kapikian, 2007). Em julho de 1999, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) suspendeu temporariamente o uso da vacina Rotashield após 15 casos de intussuscepção intestinal em crianças recentemente vacinadas.

Rotateq é uma vacina pentavalente bovina-humana, constituída por sorotipos G1, G2, G3, G4 e P[8], administrada em três doses, aos dois, quatro e seis meses de idade (Vasikari et al, 2006). Estudo realizado em três países africanos (Ghana, Kenya, Mali) de 2007 a 2009, com objetivo de avaliar a eficácia da vacina pentavalente, demonstrou uma eficácia de 39.3% contra gastroenterite grave por RV-A nos primeiros dois anos de vida (Armah et al, 2010).

Rotarix (RIX 4414) é uma vacina monovalente G1P[8], desenvolvida pela GlaxoSmithKline Biologicals, administrada em duas doses, aos dois e quatro meses de idade (Ruiz-Palacios et al, 2006). Os testes da fase 2b da vacina RIX 4414 foram realizadas em três países, Brasil, México e Venezuela e incluíram 2155 crianças. Neste estudo observou-se taxas de eficácia de 70%, 86% e 93% para gastroenterites por RV-A, gastroenterite grave por RV-A e hospitalizações por RV-A, respectivamente. Após a introdução desta vacina no calendário brasileiro de imunização em março de 2006, houve mudanças na frequência de genótipos dos RV-A, o G1P[8] que tinha uma prevalência de 14% em 2005 reduziu para 0.7% em 2008 e em contrapartida a incidência de G2P[4] aumentou de 9% para 85% no mesmo período, demonstrando uma re-emergência de G2 após a introdução da vacina monovalente (Carvalho-Costa et al, 2011).

De uma forma geral, estudos realizados com objetivo de analisar o efeito da vacinação em massa contra RV-A demonstram uma redução das diarreias por RV-A e das doenças diarreicas. Nos Estados Unidos, uma vacinação em massa de aproximadamente 2 milhões de crianças, reduziu em 89% as diarreias por RV-A e em 44% as doenças diarreicas (Eibl, 2012).

Em países africanos, a eficácia da vacina contra RV mostra dois padrões diferentes. Em África do Sul, a redução de diarreia por RV-A foi de 76.9%, uma eficácia similar a alguns países desenvolvidos, paradoxalmente, em Malawi a eficácia da vacina foi baixa 49.4% (Madhi et al, 2010). Esta diferença na eficácia da vacina pode ser devido aos genótipos circulantes a diferenças sócio-económicas entre os dois países.

### 1.9.2. Norovírus e Astrovírus

A prevenção da gastroenterite por NoV e HAstV está focada na detecção e controle de surtos. Primeiramente é necessário a identificação da fonte e o modo de transmissão e, posteriormente, a interrupção da transmissão pelo controle da contaminação de água e dos alimentos. Para tal, é importante manter a higiene das mãos dos manipuladores de alimentos, a desinfecção de superfícies contaminadas e a redução da propagação secundária de surtos através de transmissão pessoa-a-pessoa (Patel et al, 2009).

Devido ao facto de surtos por NoV ocorrerem, frequentemente, em locais institucionais como hospitais e creches, os esforços devem ser feitos para padronização de métodos eficazes para desinfecção de superfícies contaminadas. Nowak e

colaboradores (2011), avaliaram a estabilidade do NoV humanos em resposta à desinfetantes e observaram que o etanol e o isopropanol a 75%, componentes de amônia quaternária e dióxido de cloro foram ineficazes, mostrando que os NoV são resistentes a desinfetantes usados nas mãos e em superfícies.

Uma vez que as medidas de saneamento não são suficientes para evitar a ocorrência de gastroenterites por NoV, a prevenção poderia ser conseguida com uso da vacina. No entanto, os esforços para desenvolver uma vacina eficaz contra NoV têm sido dificultados pela falta de um sistema de cultura de células para propagação do vírus, pela larga diversidade genética das estirpes e pela falta de imunidade duradoura após infecção natural (Monroe, 2011).

Recentemente, VLP's consenso GII.4 foram desenhadas a partir de sequências de três cepas GII.4 geneticamente distintos com objetivo de avaliar a capacidade destes em induzir uma resposta imune cruzada contra diferentes sub linhagens do NoV GII.4 (Parra et al, 2012). Coelhos imunizados com VLP's consenso GII.4 desenvolveram altos títulos de anticorpos séricos contra VLP's derivados de GII.4 tipo selvagem. Devido à baixa reactividade cruzada apresentada para linhagens do GI, investigou-se a resposta dos anticorpos séricos para vacina bivalente contendo GI.1 do Norwalk vírus e VLP's consenso GII.4, observando-se ativação dos anticorpos séricos heterólogos e homólogos à vacina bivalente após a imunização por via intramuscular, usando o Alhydrogel como coadjuvante. Estes resultados sugerem que o uso combinado de VLP's que incorporam epítomos relevantes para múltiplas estirpes de NoV e formulações de vacinas multivalentes aumentam a amplitude da resposta imune para diferentes variantes dentro do mesmo genótipo e representam avanços para o desenvolvimento de uma vacina baseada na VLP contra NoV.

## **1.10. Epidemiologia e Distribuição Geográfica**

### **1.10.1. Rotavírus**

Estudos epidemiológicos têm sido realizados em vários países com objetivo de descrever a ocorrência dos RV-A, estes têm sido detectados em todo o mundo e são considerados os principais agentes virais da diarreia infantil (Parasher et al, 2006).

Os RV-A exibem um padrão de sazonalidade em países de clima temperado, com picos endêmicos ocorrendo nos meses mais frio do ano (Estes e Kapikian, 2007). Um estudo realizado em crianças num hospital pediátrico de Estados Unidos, durante um período de oito anos, demonstrou ausência de infecção por RV-A de julho - outubro

e, em contrapartida, durante janeiro e fevereiro observou-se um percentual elevado de infecção por RV-A, 67% e 58%, respectivamente (Brandt et al, 1983).

Konno e seus colaboradores (1983) estudaram a influência da temperatura na infecção por RV-A durante um período de sete anos no Japão e observaram que a detecção dos RV-A ocorreu mais frequentemente nos meses frios do ano, entre novembro e fevereiro, e o pico da prevalência foi em janeiro e fevereiro, onde as temperaturas chegam a 0°C.

O padrão sazonal da infecção observado nos países temperados não ocorre de maneira uniforme nos países tropicais. Uma metanálise de 26 estudos foi realizada com objetivo de analisar a sazonalidade de RV-A em países tropicais. Nesse estudo, observou-se que o RV-A responde às alterações do clima nos países tropicais, com maior frequência de infecção nos meses frios e secos do ano (Levi et al, 2009). Estudo realizado por Carvalho-Costa e colaboradores (2011) no Rio de Janeiro, também mostrou uma nítida variação sazonal da infecção por RV-A, tendo sido mais frequente entre abril - setembro.

Até ao momento são conhecidos 27 genótipos G e 35 genótipos P (Matthijssens et al, 2011). Muitos estudos de caracterização molecular dos RV-A têm demonstrado o genótipo G1P[8] como o mais predominante. Em um estudo de revisão, genótipos de 45.571 amostras positivas para RV-A coletadas entre 1973 e 2003 em 52 países de cinco continentes foram analisados (Santos e Hoshino, 2005). Nessa revisão observou-se que o genótipo G1P[8] é o mais predominante a nível mundial, com 64,7%, seguido de G2P[4] (12%), G4P[8] (8,5%) e G3P[8] (3,3%). No entanto, análise estratificada em continentes mostrou uma distribuição genotípica diferente, sendo que o G1P[8] representou mais de 71% de infecção por RV-A na América do Norte, Europa e Austrália; 34% na América do Sul e somente 23% no continente Africano.

Estudo realizado em Malawi (África) com objetivo de caracterizar G-tipo e P-tipo mostrou que os genótipos G1P[8], G8P[6], G8P[4], G1P[6], G3P[8] e G9P[6] juntos constituem 83% das infecções por RV-A (Cunliffe et al, 2010).

Potgieter e seus colaboradores (2010), observaram a ocorrência de genótipos incomuns na África do Sul. Das 111 amostras positivas, 32,4% pertenciam a G1P[6], 13,5% G1P[8], 4,5% G9P[6], 3,6% G8P[4], 3,6% G1P[4], 3,6% G8P[6] e 2,7% G2P[6].

### 1.10.2. Norovírus

Os NoV têm uma distribuição mundial. Muitos indivíduos tanto de países desenvolvidos como em desenvolvimento mostram evidências de infecção por NoV antes da fase adulta (Green, 2007).

Estudos de imunoenaios usando rVLPs para detecção de anticorpos GI e GII, demonstraram que a prevalência dos anticorpos para qualquer genogrupo aumenta gradualmente com a idade. A prevalência dos anticorpos para GII parece ser maior que para GI em muitos estudos (Green, 2007).

Surtos e casos esporádicos podem ocorrer ao longo de todo o ano, mas estudos têm observado picos sazonais de surtos por NoV nos meses mais frios do ano, no entanto, os picos nos meses quentes também têm sido descritos (Green, 2007), contudo, estes picos variam de acordo com a região estudada.

Uma análise de 1.645 amostras positivas para NoV, detectadas em surtos de 2000 a 2005 na Europa mostrou uma variação genética nas estirpes circulantes. O GII.4 foi o mais predominante e muitos estudos, em diversos outros países, têm demonstrado este padrão (Noel et al, 1999).

Estudo realizado no sudeste do Brasil mostrou que o NoV infecta todas as faixas etárias e o pico da infecção foi verificado em fevereiro - junho e setembro - outubro, meses correspondente a outono e primavera, respectivamente (Victória et al, 2007).

Ferreira e colaboradores (2010), não observaram padrão de sazonalidade na infecção por NoV num estudo de vigilância de quatro anos no Estado de Rio de Janeiro. O genogrupo GII foi o mais prevalente com 96.3%; o GII.4 foi o mais detectado, seguido de GII.6, GII.3, GII.14, GII.7 e GII.8. Foram ainda detectados os genótipos GI.2 e GI.3.

Em um estudo realizado na África do Sul, país vizinho de Moçambique, a alta taxa de detecção foi nos meses de novembro e dezembro, com predominância de GII em relação a GI (Mans et al, 2010). A alta taxa de detecção de GII também foi observada em outros países africanos, Ghana e Botswana (Silva et al, 2008; Mattison et al, 2010), demonstrando maior circulação de GII.

### 1.10.3. Astrovírus

A infecção por HAstV ocorre em todo o mundo, principalmente em crianças e pacientes imunocomprometidos. Surtos esporádicos de gastroenterites causados por HAstV têm sido relatados em pacientes idosos e militares (Mendes e Arais, 2007).

Em crianças, estudos em diferentes populações demonstram que o HAstV é a 2ª ou 3ª maior causa de gastroenterites (Mendez e Arias, 2007).

Um estudo realizado na Espanha mostrou que 80% das infecções por HAstV ocorreram em crianças com menos de três anos de idade (Guix et al, 2002). No Brasil, 85% das infecções ocorreu em crianças com menos de dois anos (Victoria et al, 2007).

A maioria das infecções por HAstV é detectada nos meses frios em regiões temperadas e na estação chuvosa em muitos países tropicais (Mendez e Arias, 2007).

Estudo realizado no Brasil por Victoria e colaboradores (2007), mostrou que a infecção por HAstV ocorre principalmente entre março - junho e não foi detectada em julho, novembro e dezembro. Na Austrália, o HAstV foi detectado durante os meses de inverno (Palombo e Bishop, 1996).

Em geral, dos oitos sorotipos de HAstV, o HAstV-1 tem sido o mais detectado, no entanto, o sorotipo predominante pode variar com o tempo e com a localização geográfica.

Estudos realizados em diferentes estados brasileiros mostraram maior predominância do sorotipo HAstV-1, que varia de 27% a 71% (Victoria et al, 2007; Resque et al, 2007; Gabbay et al, 2007). Nesses trabalhos também foi observada a ocorrência de outros sorotipos, como HAstV-2, -3, -4, -6, -8.

Na Tunísia (África), 85,5% dos HAstV detectados pertencem ao sorotipo HAstV-1 (Sdiri-Loulizi et al, 2009). Na Austrália, a prevalência dos sorotipos HAstV-1, -3 e -4 foi similar em um período de 18 anos (Schnagl et al, 2002).

Guerrero e seus colaboradores (1998), conduziram um estudo na cidade de México no qual observaram maior prevalência do HAstV-2 com 35%, seguido de HAstV-4 (15%), -3 (11%), -1 (4%) e -5 (4%). Em outro estudo, mais recente, amostras de diferentes regiões geográficas do México foram analisadas e todos os sorotipos, excepto o HAstV-5 foram detectados, sendo que o HAstV-8 foi tão frequente quanto o HAstV-1 em uma das regiões estudadas (Mendez-Toss et al, 2004).



## 1.11. Diagnóstico

### 1.11.1. Rotavírus

O diagnóstico requer detecção de vírus, antígeno viral ou demonstração de uma resposta imunológica. As técnicas para detecção de RV-A incluem microscopia eletrônica (ME); detecção de antígenos (ensaio imunoenzimático-EIE, aglutinação em latex e imunocromatografia); detecção do ácido nucléico (PAGE) e amplificação do ácido nucléico (PCR) (Estes e Kapikian, 2007).

O ME foi o primeiro método a ser usado na detecção de RV-A. Atualmente o método mais usado a nível mundial para o diagnóstico de RV-A é baseado na detecção de proteínas antigênicas de partículas virais em amostras de fezes (WHO, 2009). É um método imunoenzimático que usa anticorpos específicos para RV-A com objetivo de capturar antígenos, é apropriado para estudo de vigilância, é sensível e está adaptado para aplicação em grande número de amostras (Estes e Kapikian, 2007; WHO, 2009).

Muitos testes de detecção de antígeno têm sido comercializados, no entanto, a OMS recomenda dois testes comerciais para estudos de vigilância epidemiológica: (1) Premier™ Rotaclone® (Meridian Biosciences, Cincinnati, Ohio) e (2) IDEIA™ Rotavirus (Oxoid Limited Thermo Fisher Scientific, Cambridgeshire, United Kingdom) (WHO, 2009).

A RT-PCR convencional e *real-time* PCR são métodos de diagnósticos mais sensíveis que o EIE. A detecção do RV-A por EIE tem sido nos primeiros quatro dias após o início dos sintomas e por RT-PCR a detecção pode ser em até 3 semanas após o início dos sintomas (Estes e Kapikian, 2007). Geralmente, a RT-PCR convencional e *real-time* PCR são usados para detecção de RV-A em tecidos extra-intestinais, em estudos da duração de excreção de RV-A nas fezes, na relação entre gravidade da doença e carga viral e na caracterização molecular dos RV-A (WHO, 2009).

### 1.11.2. Norovírus

O ME foi uma ferramenta valiosa para o diagnóstico de gastroenterites virais pelo fato de ser uma técnica rápida e requerer uma quantidade mínima de amostras. No entanto, devido à baixa concentração e à estrutura morfológica dos NoV (difícil de distinguir com outras partículas presente nas fezes), torna-se difícil a utilização do ME como método rotineiro de diagnóstico de NoV (Green, 2007). Por essa razão, os NoV foram detectados também por IEM, embora o tempo de coleta das amostras seja fundamental para o sucesso da técnica. Os NoV foram detectados em 26 amostras das

52 colhidas nas primeiras 72 horas após o início da doença e em apenas duas amostras das 11 colhidas após esse intervalo (Green, 2007).

A expressão de rVLPs tem mostrado maior impacto no desenvolvimento de técnicas de diagnósticos baseadas na detecção de antígenos (EIE). Os EIEs que usam rVLPs como antígenos são sensíveis, específicos e têm sido usados em larga escala em estudos epidemiológicos (Kageyama et al, 2003; Green, 2007).

Actualmente, a RT-PCR é a técnica mais usada mundialmente para detecção de NoV, é bastante sensível e detecta até 100 cópias virais/ml (Atmar e Estes, 2001; Green, 2007). Com este método, os NoV têm sido detectados em espécimes clínicas (fezes ou vômitos), em águas, alimentos contaminados ou fômites (Atmar e Estes, 2001). A RT-PCR, junto com a análise sequencial dos produtos da PCR, tem sido usada extensivamente para a detecção e caracterização molecular dos NoV em vários surtos (Green, 2007).

Recentemente, uma técnica RT-PCR *real-time* multiplex foi desenvolvida para detecção e quantificação do vírus. A técnica detecta tanto GI e GII em uma única reação com uma redução de custo de 40% em comparação com as reações separadas para GI e GII. A técnica é sensível, específica e, devido ao custo, pode ser usada em rotina (Plang et al, 2005).

### 1.11.3. Astrovírus

Os HAstV foram, inicialmente, detectados pela EM. Esta técnica tem sido capaz de detectar entre  $10^6$  a  $10^7$  partículas virais por grama de fezes (Glass et al, 1996). Uma interpretação acurada dos resultados requer um microscopista experiente, pois apenas 10% dos HAstV apresentam a forma de estrela (Mendez e Arias, 2007). O desenvolvimento de EIE, com base nos anticorpos monoclonais, que detecta diferentes sorotipos de HAstV facilitou o diagnóstico laboratorial permitindo uma detecção rápida em larga escala nos estudos epidemiológicos (Herrmann et al, 1990).

A verdadeira incidência de HAstV foi subestimada quando usava-se ME e EIE devido a baixa sensibilidade destes testes (Royuela et al, 2005). Actualmente, a RT-PCR é a técnica mais usada a nível mundial para detecção de HAstV, é mais sensível em comparação com EIE, detectando de 10 a 100 partículas virais por gramas de fezes (Mitchel et al, 1995; Mendez e Arias, 2007).

Estudo comparativo de dois métodos, EIE e RT-PCR, demonstrou a maior sensibilidade de RT-PCR, com uma detecção de 32% de HAstV em amostras fecais contra 10% de EIE (Mithel et al, 1995).

Atualmente, a RT-PCR *real-time* tem sido descrita como mais sensível, com uma capacidade de detecção de HAstV de até 0.0026 unidades de partículas infecciosas por microlitro (UI/ $\mu$ l) e tem um tempo de ensaio reduzido comparativamente à RT-PCR convencional (Royuela et al, 2005).

## 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A doença diarreica é uma das principais causas de mortalidade infantil em todo o mundo. Moçambique é o 23º país com a taxa mais elevada de mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade no mundo, com uma em cada seis crianças a morrer antes de completar cinco anos de vida, muitas vezes por doenças que podem ser tratadas ou prevenidas (UNICEF, 2006).

Num total de 11.752 mortes registradas no país, 43% eram crianças menores de 5 anos de idade (INCAM, 2009). A malária, as infecções respiratórias agudas e a diarreia são as três principais causas de morte em crianças menores de 5 anos de idade em Moçambique, entretanto, o peso percentual de cada doença varia de uma província para outra (MICS, 2008 e INCAM, 2009). Segundo Black e colaboradores (2010), das 110.420 mortes registradas em crianças com menos de cinco anos de idade em Moçambique, 13.105 (11.8%) foram causadas por diarreia. A prevalência da doença diarreica entre estas crianças é de 18% com uma variação de 13 a 23% entre as províncias moçambicanas (MICS, 2008).

Em Moçambique, há poucos dados disponíveis em relação à circulação dos vírus entéricos. Estudos sobre frequência de infecção por RV-A em crianças foram realizados por Hung et al (1994) na cidade de Maputo usando EIE e Mandomando et al (2007) na Manhica usando um teste rápido, nos quais observou-se uma taxa de 25% e 0,6% de casos positivos para RV-A, respectivamente.

Estudo soropidemiológico realizado na África do Sul por Smit et al (1999), demonstrou uma prevalência de 83,3% de seropositividade para NoV em um grupo de moçambicanos refugiados na África do Sul.

Estudos realizados em diferentes países africanos tais como Ghana (Silva et al, 2008), África do Sul (Seheri et al, 2010, Mans et al, 2010), Botswana (Mattison et al, 2010), Tunísia (Sdiri-Loulizi et al, 2010), Kenya (Nyangao et al, 2010), Malawi (Cunliffe et al, 2010) e Congo (Kabue et al, 2010), têm demonstrado a circulação e importância de RV-A, NoV e HAstV no continente.

Assim, este trabalho pretende avaliar a presença de RV-A, NoV e HAstV, e genotipar os RV-A em crianças com menos de cinco anos de idade. O resultado poderá auxiliar na compreensão da epidemiologia molecular e circulação dos vírus entéricos. Contribuirá na implantação de um sistema de vigilância, o que vai ajudar no diagnóstico das gastroenterites virais, possibilitando o reconhecimento da frequência destas

infecções em crianças hospitalizadas com doenças diarréicas. Desta forma, medidas para controle e prevenção de gastroenterites virais em Moçambique poderão ser propostas, incluindo a vacinação contra RV-A.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- ✓ Estimar a frequência de infecção por RV-A, NoV e HAstV em crianças menores de cinco anos de idade hospitalizadas com doença diarréica e comorbidades no Hospital Geral de Mavalane na cidade de Maputo, Moçambique, entre novembro de 2011 a fevereiro de 2012.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- ✓ Caracterizar molecularmente os diferentes genótipos de RV-A nas crianças positivas para este patógeno, usando a RT-PCR multiplex para VP4 e sequenciamento da VP7.
- ✓ Descrever as diferenças nas frequências de infecção por RV-A, NoV, HAstV em diferentes faixas etárias.
- ✓ Identificar os distintos genogrupos de NoV na população estudada, com base na amplificação da região D do capsídeo VP1 usando RT-PCR.
- ✓ Discutir a influência do aleitamento materno na infecção por RV-A, NoV e HAstV na população estudada.
- ✓ Discutir a influência da presença de comorbidades (malária, infecções respiratórias agudas, infecção pelo HIV e desnutrição proteico-calórica) sobre a taxa de detecção de agentes virais entre as crianças hospitalizadas com doenças diarréicas no período de estudo.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Descrição da área do estudo**

Este estudo foi realizado no Hospital Geral de Mavalane (HGM), localizado no bairro de Mavalane, na Cidade de Maputo, Moçambique. A cidade de Maputo apresenta um clima tropical de savana, que faz fronteira com um clima subtropical úmido. É uma cidade relativamente seca, com uma média de 761 milímetros de precipitação por ano. A estação chuvosa é relativamente curta, compreendendo os meses de Novembro a Março. A cidade também apresenta, visivelmente, estações mais quentes e mais frias, sendo janeiro o mês mais quente e julho o mais frio.

O HGM é um hospital terciário, especializado em serviços de pediatria, pertencente à rede pública de saúde da Cidade de Maputo. Possui ambulatório de pediatria geral e um departamento para internação dos casos de maior gravidade.

A Área de Saúde de Mavalane é a maior da Cidade de Maputo, ocupando uma superfície de 168,4 km<sup>2</sup> e atende a uma população estimada em 609,889 habitantes, cerca de 50% da população da capital do País.

Durante o período do estudo, novembro de 2011 a fevereiro de 2012, a enfermaria de pediatria de HGM teve 1.402 internações, das quais 1.195 foram crianças com menos de cinco anos de idade. As infecções respiratórias agudas, o HIV/SIDA, a malária, a diarreia e a malnutrição foram as principais causas das internações, sendo que a diarreia foi responsável por 18,7% (224/1.195) das hospitalizações, segundo o livro de registro de internações da pediatria do HGM.

### **4.2. Desenho do Estudo**

Com objectivo de estudar as diarreias agudas causadas por RV-A, NoV e HAstV, foi realizado um estudo descritivo, entre novembro de 2011 e fevereiro de 2012, compreendendo, portanto, um período de quatro meses.

As visitas à enfermaria pediátrica foram feitas cinco vezes por semana, de segunda a sexta-feira, durante o período de estudo. As variáveis incluídas neste estudo foram: sexo, idade, mês e tempo de internação, idade do desmame, uso de antibióticos e presença de comorbidades (anexo 2).

Procuramos incluir neste estudo prospectivo todas as crianças admitidas na enfermaria da pediatria com quadro de diarreia durante o período do estudo, no entanto, estudamos apenas 123 crianças de um total de 224 que preenchiam os critérios de

inclusão com uma perda de 45%. Esta perda deveu-se ao fato de algumas crianças terem sido internadas e recebido alta nos finais de semana e feriados, dificultando a coleta das amostras.

### **Critérios de inclusão**

Foram incluídas neste estudo, crianças internadas na enfermaria da pediatria do HGM, na faixa de zero a cinco anos de idade que apresentassem no livro de registo de internação quadro de doença diarréica, independentemente de ter ou não outros quadros infecciosos associados (comorbidades).

### **Critérios de exclusão**

Foram excluídas do estudo crianças que não apresentavam quadro de diarreia aguda e aquelas cujos pais/responsáveis não aceitaram assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1).

### **4.3. Definição de caso de doença diarréica aguda**

Os casos de doença diarreica aguda foram definidos clinicamente como aumento de número de evacuações, pelo menos três vezes no período de 24 horas, de fezes moles (aquosas ou de pouca consistência) frequentemente acompanhada de vômitos, febre ou dores abdominais.

### **4.4. Coleta, transporte e conservação das amostras fecais**

A coleta das amostras foi feita em coletores fecais sem conservantes. As amostras fecais foram retiradas das fraldas usadas pelas crianças, após evacuação, com espátulas de madeira.

As amostras foram obtidas num período de até 48 horas após a internação da criança e transportadas em caixa térmica refrigerada com gelo reciclável, até ao Laboratório de Isolamento Viral do Instituto Nacional de Saúde (INS), Moçambique. No Laboratório de Isolamento Viral, as amostras fecais foram aliqüotadas em duplicado nos criotubos de 2 ml e conservadas a -70°C.

Uma alíquota das amostras foi enviada ao Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA), no Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) no Rio de Janeiro, Brasil, segundo o protocolo da Comissão Interna de Biossegurança

do Instituto Nacional de Saúde de Moçambique, padronizado pela *International Air Transport Association* (IATA). Os testes laboratoriais foram realizados no LVCA.

No LVCA as amostras foram conservadas a -20°C até ao momento da análise laboratorial.

#### **4.5. Considerações Éticas**

Este estudo teve aprovação do Comité Nacional de Bioética para Saúde de Moçambique, sob nº 281/CNBS/11 (anexo 3) e pelo Comité de Ética em pesquisa da Fiocruz da Fiocruz - CEP 311/06.

#### **4.6. Diagnóstico Laboratorial**

A análise laboratorial das amostras fecais para detecção dos RV, NoV e HAstV foi feita com base nos procedimentos operacionais padronizados (POP's) do LVCA.

A figura 4.1 ilustra a sequência dos testes laboratoriais realizados na detecção de RV, NoV e HAstV. Primeiramente, todas as amostras foram testadas para RV-A com base no EIE e PAGE. As amostras positivas para RV-A no EIE ou no PAGE seguiram para genotipagem usando-se a RT-PCR multiplex para VP4 e sequenciamento para VP7.

As amostras negativas para RV-A foram testadas para NoV com base na amplificação da região B da ORF1. As amostras positivas pela região B foram novamente amplificadas pela região D da ORF2 para a classificação dos NoV em genogrupos.

O fluxo seguiu com amostras negativas para testagem de HAstV com base na amplificação da ORF2.



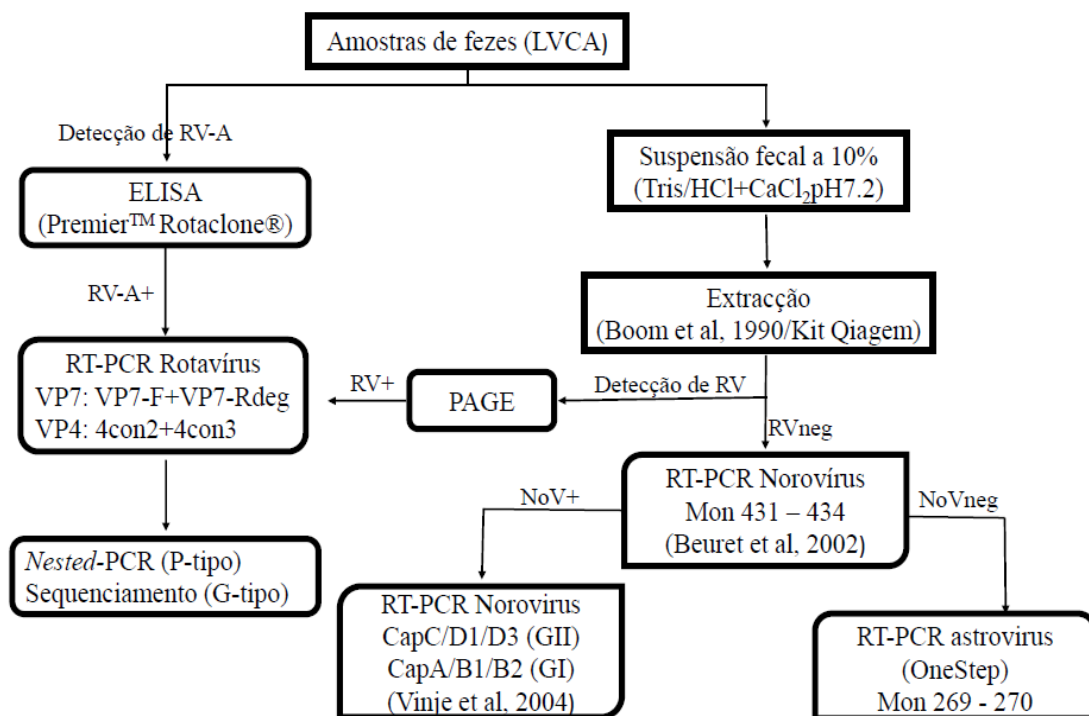


Figura 4.1: Fluxograma para detecção de RV, NoV e HAstV.

#### 4.6.1. Suspensão Fecal a 10%

Para obtenção de suspensões fecais a 10%, colocou-se 0.1 g de amostra fecal num microtubo de 1,5 ml e adicionou-se 1 ml da solução tampão Tris/HCl 0.01M + CaCl<sub>2</sub> 0,0015M, pH 7.2. Após a homogeneização por 10 segundos no vórtex e centrifugação a 3000 rpm por 20 minutos, a 4°C, coletou-se 800 µl de sobrenadante que foram armazenados a 4°C até ao momento da extração.

#### 4.6.2. Detecção de RV-A por ensaio imunoenzimático (EIE)

A detecção de RV-A por EIE foi realizada a partir do kit comercial Premier™ Rotaclone® (Meridian Biosciences, Cincinnati, Ohio) cat. No 696004. O ensaio foi realizado segundo as recomendações do fabricante.

#### 4.6.3. Extração de ácidos nucleicos

Para a extração do RNA viral usou-se dois métodos diferentes: o kit comercial Qiagen (QIAamp Viral RNA Mini Kit (250), cat. No 52906), segundo as recomendações do fabricante e o método de sílica descrita pelo Boom et al (1990). Os dois métodos foram padronizados pelo LVCA e estão em uso, não havendo diferenças

em termos de sensibilidade entre as duas técnicas. As primeiras 48 amostras foram extraídas pelo método de Boom et al (1990) e as restantes 75 pelo kit comercial Qiagen.

Para a extração do RNA viral pelo método de sílica, usou-se a metodologia descrita por Boom et al (1990), contudo, a metodologia foi modificada para otimizar a técnica: 400 µl da suspensão fecal a 10% foram adicionados a 1,0 ml do tampão L6, após a homogeneização em vórtex por 15 segundos incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 15 µl de sílica, homogeneizou-se em vórtex por 15 segundos e incubou-se por 20 minutos em agitador orbital à temperatura ambiente. Centrifugou-se por 30 segundos a 13.200 rpm e descartou-se o sobrenadante no pote de NaOH 10M. De seguida, lavou-se o sedimento com 1,0 ml de L2, 1,0 ml de etanol a 70% (4°C) e 1,0 ml de acetona P.A. (4°C), as três etapas de lavagem foram entrecaladas com homogeneização em vórtex e centrifugação por 30 segundos a 13.200 rpm. Para secagem completa do sedimento foi feita uma incubação de 15 minutos a 56°C em banho-maria com tampas do aparelho e dos microtubos abertas. Ressuspendeu-se a sílica em 40 µl de água Mill-Q estéril e após homogeneização em vórtex, incubação em banho-maria a 56°C por 15 minutos e centrifugação por 3 minutos a 13.200 rpm, coletou-se 30 µl do sobrenadante; ressuspendeu-se a sílica pela segunda vez em 30 µl e coletou-se 30 µl totalizando 60 µl de RNA extraídos. Os 60 µl obtidos da extração foram distribuídos em 2 microtubos, 30 µl em cada, e estocados a -20°C para procedimentos posteriores (PAGE e RT-PCR).

#### **4.6.4. Detecção de RV em electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)**

Montou-se o recipiente onde o gel se forma usando duas placas de vidro e três espessadores de 1 mm entre as placas e vedou-se com agarose a 1,5%. Primeiramente colocou-se o gel separador (7.5%) dentro da placa deixando um espaço para o gel concentrador (4%) (Quadro 4.1) e o pente, adicionou-se 500 µl de butanol sobre o gel separador ainda não polimerizado para evitar o contacto da acrilamida com o ar e agilizar o nivelamento do gel; após a polimerização do gel separador descartou-se o butanol, colocou-se o gel concentrador e inseriu-se o pente imediatamente e aguardou-se pela polimerização.

Após a polimerização completa, retirou-se o pente e montou-se a placa com géis polimerizados na cuba de electroforese e colocou-se o tampão de corrida (tris-glicina). Aplicou-se 20 µl do RNA viral extraído após adição de 10 µl de MIX 2X. Após a

corrida, numa corrente constante a 25 mA por 1 hora e 40 minutos, o gel foi corado pelo método de impregnação pela prata.

#### **Coloração de gel por nitrato de prata para visualização dos 11 segmentos genômicos de RV**

Para a coloração do gel por nitrato de prata, primeiro colocou-se o gel no fixador composto por 10% de etanol P.A. (95%) e 0.5% de ácido acético P.A. (100%) durante 30 minutos no agitador orbital depois impregnou-se com nitrato de prata (0,011 M) colocando-se no agitador orbital por 30 minutos. Após a impregnação com nitrato de prata, revelou-se o gel com hidróxido de sódio P.A. e 0.75% de formaldeído P.A. (37%), visualizou-se o perfil electroforético (bandas) em um negatoscópio e conservou-se o gel a 15% de etanol P.A (95%) antes de desidratação.

Quadro 4.1: Reagentes e respectivos volumes usados para obtenção dos geis separador e concentrador na detecção dos RV em PAGE.

<b>Gel Separador a 7,5%</b>		<b>Gel Concentrador a 4%</b>	
<b>Reagentes</b>	<b>Volume</b>	<b>Reagentes</b>	<b>Volume</b>
Água tipo 2	5,7 ml	Água tipo 2	1,3 ml
Tampão 4X "Lower Tris"	2,5 ml	Tampão 4X "Lower Tris"	0,5 ml
Acrilamida "Bis"	1,5 ml	Acrilamida "Bis"	160 µl
Persulfato de Amónia 5%	300 µl	Persulfato de Amónia 5%	60 µl
TEMED	5 µl	TEMED	3 µl

#### **4.6.5. Reacção da transcriptase reversa para obtenção de cDNA usado na genotipagem de RV-A e detecção de NoV**

A preparação do cDNA a partir do RNA extraído foi realizada com o Kit High Capacity (AB Applied biosystems lot nº 1111107). Em um microtubo de 500 µl colocou-se 2 µl de dimetil sulfóxido (DMSO), adicionou-se 10 µl do RNA extraído e colocou-se no termociclador a 97°C por 7 minutos para desnaturação. Colocou-se em banho de gelo por 2 minutos e adicionou-se 38 µl da mistura (Quadro 4.2) para obtenção do cDNA, totalizando um volume de 50 µl. Colocou-se no termociclador durante 2 horas e 10 minutos, utilizando um programa específico com temperatura e tempos recomendados pelo fabricante da enzima.

Quadro 4.2: Reagentes usados na obtenção de cDNA a partir do RNA extraído.

Reagente	Volume por Reação
H2O livre DNase/RNase	14,8 µl
10X RT Buffer	8,0 µl
10X dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) 100mM	3,2 µl
10X RT Random Primer	8,0 µl
Multiscribe RT 50U/µl	4,0 µl
Total	38 µl

#### 4.6.6. Detecção de NoV por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de cDNA

A detecção de NoV foi realizada por PCR com base na amplificação da região B da ORF1. Foram usadas quatro sequências de iniciadores para detecção de NoV (Mon 432 / Mon 434 para GI e Mon 431 / Mon 433 para GII) numa mesma reacção. Para tal, adicionou-se 5 µl de cDNA a 20 µl da mistura de PCR (Quadro 4.3), centrifugou-se por 20 segundos a 16.000 rpm e colocou-se no termociclador para amplificação, com uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, de anelamento por 60°C por 1 minuto e de extensão a 72°C por 1 minuto e uma etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos.

Quadro 4.3: Reagentes utilizados na detecção de NoV por PCR a partir do cDNA.

Reagentes	Volume por reação
dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) 2.5 mM	2,0 µl
10X PCR Buffer (INVITROGEN)	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (INVITROGEN)	0,8 µl
Primers: Mon 431 - 434 [100 µM]*	0,3 µl
Taq DNA Polimerase 5 U/µl (INVITROGEN)	0,3 µl
Água DNase/RNase free	14,1 µl
Total	20 µl

\*A sequência dos iniciadores usados na detecção estão decritos no quadro 4.11

#### 4.6.7. Genogrupagem de NoV (região D)

A genogrupagem de NoV em GII e GI foi realizada por PCR com base na amplificação da região D da ORF2 para todas amostras que foram positivas para NoV após amplificação pela região B.

Todas as amostras positivas pela região B foram submetidas a uma PCR para genogrupagem em GII. Para tal, adicionou-se 10 µl de cDNA a 40 µl da mistura de PCR (Quadro 4.4), centrifugou-se por 20 segundos a 16.000 rpm e colocou-se no termociclador para amplificação, com uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, de anelamento por 44°C por 1 minuto e de extensão a 72°C por 1 minuto e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Amostras negativas para GII foram submetidas a uma nova PCR para genogrupagem em GI, seguindo as mesmas etapas e reagentes usados na genogrupagem em GII, com exceção dos iniciadores, conforme descrito acima.

Quadro 4.4: Reagentes utilizados na genogrupagem de NoV em GII e GI.

Reagentes	Volume por reacção
Água DNase/RNase free	26,3 µl
10X Buffer (INVITROGEN)	5,0 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (INVITROGEN)	1,5 µl
dNTPs 2,5 mM (INVITROGEN)	4,0 µl
Primer GII: CapC/D1/D3 [50µM]* ou Primer GI: CapA/B1/B2[50µM]*	3,0 µl (1,0 µl cada) 3,0 µl (1,0 µl cada)
DNA Taq-polimerase 5 U/µl (INVITROGEN)	0,2 µl
<b>Total</b>	<b>40,0 µl</b>

\*A sequência dos iniciadores usados na detecção estão descritos no quadro 4.11

#### 4.6.8. Detecção de HAstV por reação em cadeia da polimerase (PCR) - One Step

Para detecção de HAstV por PCR utilizou-se o kit *SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity* Cat. No. 12574-035 (INVITROGEN). Adicionou-se 5 µl de RNA a 20 µl da mistura de PCR (Quadro 4.4), centrifugou-se por 20 segundos a 16.000 rpm e colocou-se no termociclador para amplificação da ORF2, com uma etapa de pré-desnaturação a 50°C por 30 minutos e 94°C por 2 minutos seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos,

anelamento a 50°C por 30 segundos, extensão a 68°C por 1 minuto e uma etapa final de extensão a 68°C por 5 minutos.

Quadro 4.5: Reagentes utilizados na detecção de HAstV por RT-PCR.

Reagentes	Volume por reação
Água DNase/RNase free (INVITROGEN)	5,0 µl
2x Reaction Mix (INVITROGEN)	12,5 µl
Primers: [10µM]* Mon 269 - 270	2,0 µl
SuperScript III/Platinum Taq High Fidelity Enzyme Mix	0,5 µl
Total	20 µl

\*A sequência dos iniciadores usados na detecção estão descritos no quadro 4.11

#### 4.6.9. Detecção e Caracterização Molecular de RV-A por RT-PCR

A detecção e caracterização de RV-A por RT-PCR foi realizada apenas em amostras positivas por EIE ou PAGE. A genotipagem de RV-A foi realizada com base nas duas proteínas estruturais VP4 (P-tipo) e VP7 (G-tipo). O processo envolveu duas etapas, uma etapa de detecção de VP4 e VP7, seguida pela etapa de genotipagem.

##### Detecção de VP4

Para a detecção de VP4, adicionou-se 2,5µl do cDNA a 22,5 µl da mistura da reação (Quadro 4.5), centrifugou-se por 20 segundos a 16.000 rpm e colocou-se no termociclador para amplificação, com uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Quadro 4.6: Reagentes utilizados na detecção de VP4.

Reagentes	Volume por reação
dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) 2.5 mM	2 µl
10X PCR Buffer (INVITROGEN)	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (INVITROGEN)	1,25 µl
Primers consensuais VP4*	1,0 µl
DNA Taq-polimerase 5 U/µl (INVITROGEN)	0,125 µl
Água DNase/RNase free	15,625 µl
Total	22,5 µl

\*A sequência dos iniciadores usados na detecção de VP4 estão descritos no quadro 4.11

### Genotipagem de VP4 (P-tipo)

Para genotipagem da VP4 (P-tipo), fez-se uma *Nested-PCR* multiplex. Adicionou-se 1 µl do produto da primeira PCR a 24 µl do mistura da reação (Quadro 4.6), centrifugou-se por 20 segundos a 16.000 rpm e colocou-se no termociclador para amplificação, com uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Quadro 4.7: Reagentes utilizados na genotipagem de VP4 a partir do produto da primeira PCR.

<b>Reagentes</b>	<b>Volume por reação</b>
dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) 2.5 mM	2 µl
10X PCR Buffer (INVITROGEN)	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (INVITROGEN)	1.0 µl
Primers específicos P-tipo*	0.5 µl (cada primer), total 3,5µl (P)
Primers consensuais P-tipo*	0.5 µl
DNA Taq-polimerase 5 U/µl (INVITROGEN)	0.125 µl
Água DNase/RNase free q.s.p.	24 µl

\*A sequência dos sete iniciadores específicos VP4 (P-tipo) estão descritos no Quadro 4.11

### Detecção de VP7

Para a detecção de VP7, diferentes pares de iniciadores consensuais foram usados até que se conseguisse um resultado satisfatório. Os pares dos iniciadores consensuais usados foram: 9con1/9con2; Beg9/End9 e VP7-F/VP7-Rdeg (Quadro 4.10), em três reações diferentes.

A detecção da VP7 envolveu duas etapas. Na primeira etapa, a metodologia usada foi similar aquela usada na detecção da VP4, com exceção dos iniciadores consensuais usados, sendo que nesta etapa usou-se os iniciadores 9con1/9con2. Após a obtenção do produto da primeira etapa, realizou-se uma segunda etapa, na qual, 2 µl do produto da primeira PCR foram adicionados a 23 µl do mistura da reação (Quadro 4.7), centrifugou-se por 20 segundos a 16.000 rpm e colocou-se no termociclador para amplificação, com uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

#### Quadro 4.8: Reagentes utilizados na detecção de VP7.

Reagentes	Volume por reação
Água DNase/RNase free	15,2 µl
10X Buffer (INVITROGEN)	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (INVITROGEN)	1,0 µl
dNTPs 2,5 mM (INVITROGEN)	2,0 µl
Primer forward: VP7-F [10 mM] *	1,0 µl
Primer reverse: VP7-Rdeg [10 mM]*	1,0 µl
DNA Taq-polimerase <i>recombinant</i> (5U/µl) (INVITROGEN)	0,3 µl
<b>Total</b>	<b>23,0 µl</b>

\*A sequência dos iniciadores usados na detecção de VP7 usados estão decritos no quadro 4.11

#### Visualização dos produtos da RT-PCR e *Nested-PCR* em gel de agarose

Os produtos da RT-PCR e *nested-PCR* foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (INVITROGEN). Pesou-se 1,2g de agarose (cat No. 16500-500), diluiu-se em 80 ml do tampão TBE 0,5X, aqueceu-se no microondas durante 2 minutos e adicionou-se 4 µl do brometo de etídio cat No. 15585-011 (INVITROGEN). Adicionou-se 2 µl do tampão azul bromofenol a 10 µl dos produtos amplificados e aplicou-se no gel. Para a identificação do tamanho dos produtos, usou-se um marcador molecular de 100 pares de bases (INVITROGEN). Após 70 minutos de corrida a 120volts, o gel foi visualizado no fotodocumentador (Gel Logic 212 Imaging Sistem da KODAK).

#### 4.6.10. Sequenciamento de VP7

Devido a dificuldade de genotipar a VP7 com os iniciadores específicos usando a *Nested-PCR* multiplex, a caracterização molecular da VP7 foi realizada com base no sequenciamento dos nucleotídeos.

Os produtos da segunda etapa da detecção da VP7 foram purificados (PCR Purification Kit – QIAGEN Cat No. 28106) e quantificados (Quant - IT dsDNA HS Assay Kit – INVITROGEN Lot No. 863178), seguindo as recomendações dos fabricantes.

Após purificação e quantificação, estes produtos foram submetidos a uma reação de sequenciamento (Big Dye® Terminator v3.1 - Applied boystems Lot No.



0904266). Em uma placa de 96 poços colocou-se os reagentes para sequenciamento (Quadro 4.8), centrifugou-se e colocou-se num termociclador para amplificação, com uma etapa inicial de 96°C por 1 minuto e 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a reação de sequenciamento, levou-se a placa a PDTIS do IOC-FIOCRUZ para leitura das sequências.

Quadro 4.9: Reagentes usados na reação de sequenciamento para genotipagem de VP7 (G-tipo).

Reagentes	Volume por reacção
Primers: VP7-F ou VP7-Rdeg [2mM]	2,0 µl
DNA purificado	2,0 µl
Água DNase/RNase free	2,0 µl
Big Dye	2,0 µl
Tampão Big Dye	2,0 µl
Total	10,0 µl

#### 4.6.11. Análise de sequências

Para o alinhamento das sequências obtidas neste trabalho, foi usado o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*. As sequências dos protótipos dos rotavírus G12 para análise foram obtidas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Foi calculada a matriz de similaridade entre as sequências deste trabalho e sequências dos protótipos. A análise filogenética foi realizada no programa MEGA 4. A distância genética foi calculada pelo modelo *Kimura-2-parâmetros* usando o método *neighbor-joining* com *bootstrap* de 2000 réplicas.

Quadro 4.10: Amostras protótipos de RV-A, utilizados nas análises filogenéticas obtidas no *GenBank*, com o respectivo número de acesso, país e espécie de origem.

<b>Protótipo</b>	<b>Rotavírus (G12P[6]/[8])</b>	<b>Ano</b>	<b>País</b>	<b>Origem</b>	<b>Num. acesso GenBank</b>
ISO16	G12P[6]	2003 - 2006	Índia	Humana	DQ099751
ISO129	G12	2003 - 2006	Índia	Humana	EU0164457
VU08-09.39	G12P[8]	2008	Estados Unidos	Humana	JF790346
CU616TK/09	G12P[8]	2009	Tailândia	Humana	JN706505
Arg7500/Arg/2009	G12P[8]	2009	Argentina	Humana	JN088466
mani-485/08	G12P[6]	2008	Índia	Humana	GQ229068
MAL12	G12P[6]	2006 - 2007	Malawi	Humana	JN591403
SA4950JHB	G12P[6]	2004	África do Sul	Humana	EU284739
SA4958JHB	G12P[6]	2004	África do Sul	Humana	EU284740

Quadro 4. 11: Sequência de iniciadores utilizados na detecção de RV-A, NoV e HAstV.

Iniciadores de detecção	Sequência 5' → 3'	Tamanho do fragmento	Referência
<b>Rotavírus</b>			
G Tipo → 9con1 + 9con2	9con1 (+) TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	904pb	Das et al, 1994
	9con2 (-) GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	904pb	Fischer et al, 2000
G Tipo → Beg9 + End9	Beg9 GGC TTT AAA AGA AAT TTC CGT CTG G	1062pb	Protocolo OMS
	End9 GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	1062pb	Protocolo OMS
G Tipo → VP7-F + VP7-Rged	VP7-F ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC CA	881pb	Protocolo OMS
	VP7-Rdeg AAC TTG CCA CCA TYT YTT CC	881pb	Protocolo OMS
P Tipo → 4con2 + 4con3	4con2 (-) ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	876pb	Gentsch et al, 1992
	4con3 (+) TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	876pb	Protocolo OMS
<b>Primers / Genótipos P</b>			
1T-1 / P[8]	TCT ACT TGG ATA ACG TGC	345pb	Gentsch et al, 1992
2T-1 / P[4]	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	483pb	Gentsch et al, 1992
3T-1 / P[6]	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	267pb	Gentsch et al, 1992
4T-1 / P[9]	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	391pb	Gentsch et al, 1992
1T-1VN / P[8]	TGT ACT GGA TCG ACG TGC	345pb	Protocolo OMS
1T-1Wa / P[8]	TCT ACT GGG TTA ACG TGC	345pb	Protocolo OMS
5T-1 / P[10]	ATC ATA GTT AGT AGT CGG	583pb	Protocolo OMS
<b>Norovírus (Detecção)</b>			
Mon 431 <sup>II</sup>	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	213pb	Beuret et al, 2002
Mon 432 <sup>I</sup>	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	213pb	Beuret et al, 2002
Mon 433 <sup>II</sup>	GAA YCT CAT CCA YCT GAA CAT	213pb	Beuret et al, 2002
Mon 434 <sup>I</sup>	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT	213pb	Beuret et al, 2002
<b>Norovírus Genogrupo I (GI)</b>			
Cap A (-)	GGC WGT TCC CAC AGG CTT	177pb	Vinje et al, 2004
Cap B2 (+)	TAT GTI GAY CCW GAC AC	177pb	Vinje et al, 2004
Cap B1 (+)	TAT GTT GAC CCT GAT AC	177pb	Vinje et al, 2004
<b>Norovírus Genogrupo II (GII)</b>			
Cap C (-)	CCT TYC CAK WTC CCA YGG	253pb	Vinje et al, 2004
Cap D1 (+)	TGT CTR STC CCC CAG GAA TG	253pb	Vinje et al, 2004
<b>Astrovírus</b>			
Mon 269 (+)	CAA CTC AGG AAA CAG GGT GT	449pb	Noel et al, 1995
Mon 270 (-)	TCA GAT GCA TTG TCA TTG GT	449pb	Noel et al, 1995

<sup>II</sup>: GenogrupoII; <sup>I</sup>: Genogrupo I; I - Iosine; Y - Pirimidina (C/T); R - Purina (A/G); S - Strong (C/G)

#### **4.7. Análise de Dados**

Os dados obtidos dos pacientes (variáveis clínico-epidemiológicas) e os resultados dos testes laboratoriais para diagnóstico das infecções por vírus causadores de diarreia aguda compuseram um banco de dados criado no programa Excel (Microsoft Office).

Foi realizada uma análise estatística descritiva com cálculo de frequências e intervalos de confiança (IC). Os testes de qui-quadrado, com correção de Yates quando necessário e qui-quadrado de tendência linear foram utilizados para avaliar a associação entre variáveis categóricas, conforme especificado na Sessão Resultados, sempre com nível de significância estipulado em  $p < 0,05$ .

Todos os cálculos foram analisados no programa estatístico Epi Info version 3.5.2. (CDC, Atlanta, US, 2010).

## 5. RESULTADOS

Os resultados encontrados neste trabalho são apresentados a seguir através de gráficos, tabelas e figuras. É ainda apresentado um texto interpretando esses resultados de modo a permitir uma melhor explanação dos mesmos e dessa forma responder com clareza aos objetivos definidos.

### 5.1. Descrição das características demográficas

#### Procedência

As 123 crianças incluídas no presente estudo eram residentes da cidade de Maputo, sendo distribuídas por 18 bairros. 30,1% (37/123) dos casos eram provenientes do bairro de Maxaquene, 16,6% (20/123) de Polana Caniço, 8,9% (11/123) de Magoanine e 8,9% (11/123) de Hulene. Juntos, estes quatro bairros representaram 64,5% dos casos estudados (Figura 5.1).

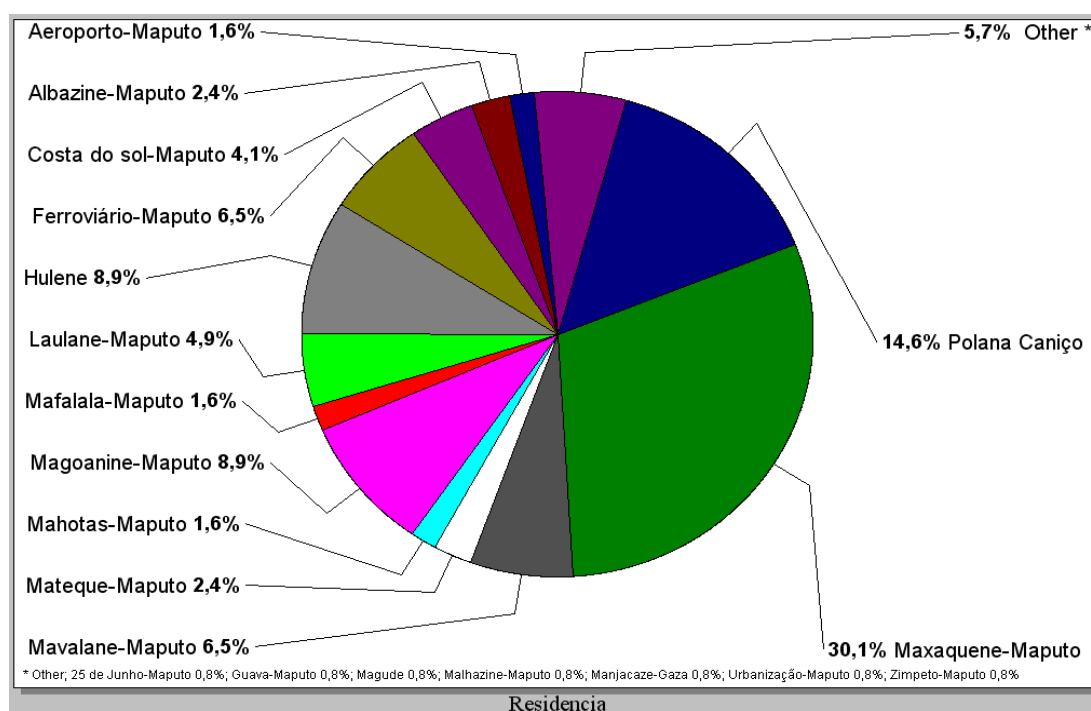


Figura 5.1: Local de residência dos 123 casos de diarreia aguda estudados em Maputo, 2012.

### Sexo

Entre as crianças estudadas, observou-se que 55,3% (68/123) eram do sexo masculino e 44,7% (55/123) do sexo feminino (Figura 5.2).

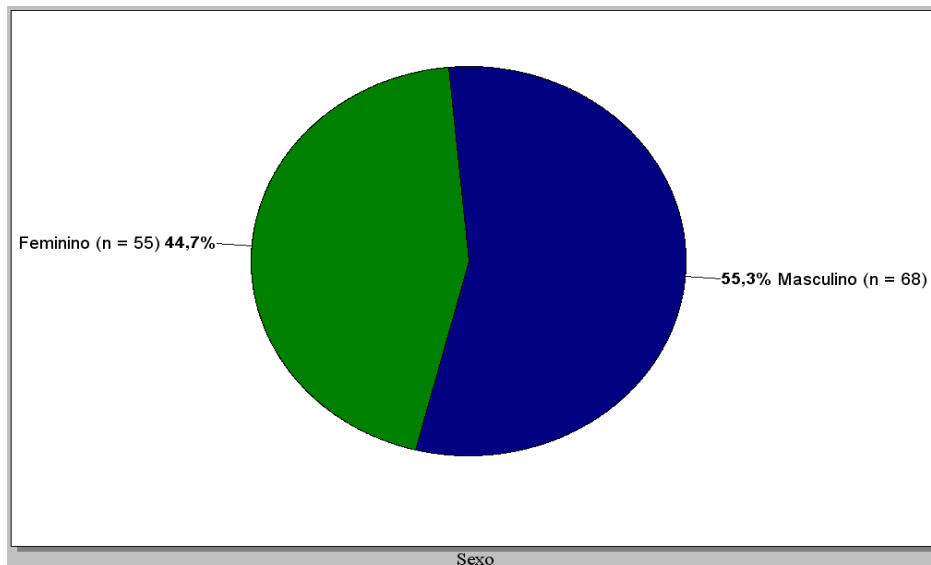


Figura 5.2: Distribuição dos 123 casos de diarreia aguda estudados em Maputo, 2012, por sexo.

### Idade

A idade das crianças durante o período do estudo variou de 10 dias a 48 meses, com uma mediana de 11 meses (IIQ = 7 - 18) e uma média de 13,8 meses (DP = 9,8 meses). A maioria da população do estudo (91,9%) tinha até 2 anos de idade. Em relação a distribuição por faixa etária observou-se maior proporção na faixa etária dos 7 aos 12 meses (39,0%, 48/123), seguida da faixa dos 13 - 24 meses (34,1%, 42/123) (Figura 5.3).

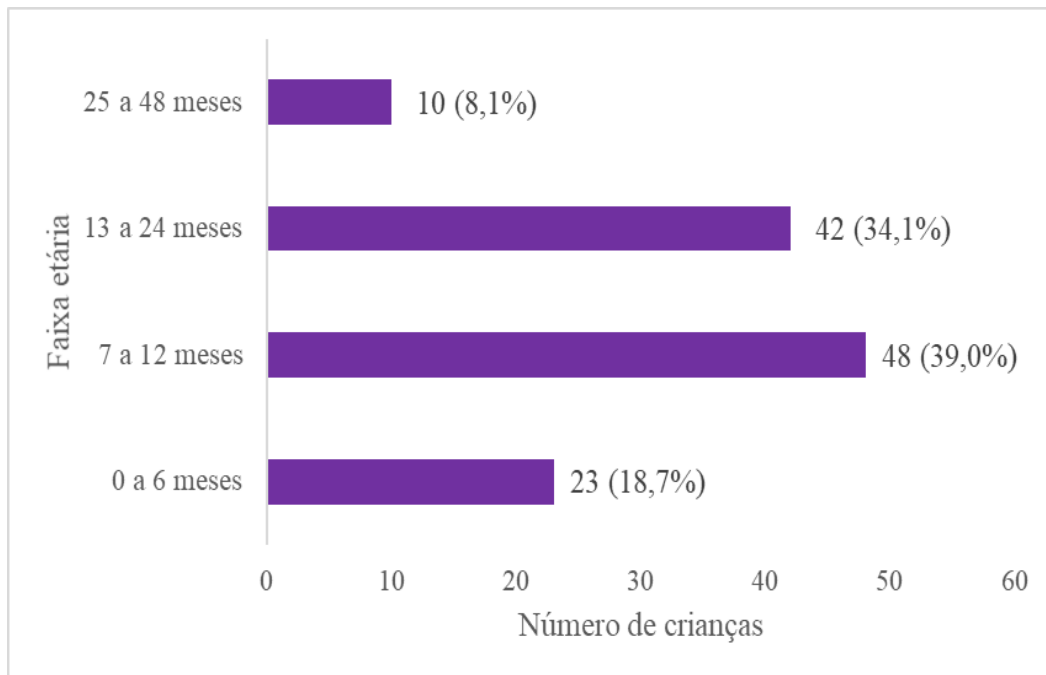


Figura 5.3: Distribuição dos 123 casos de diarreia aguda estudados em Maputo, 2012, por faixa etária.

#### Comorbidade

Para além da diarreia, das 123 crianças estudadas 61% dos participantes tinham pelo menos uma comorbidade. As comorbidades (outros quadros infecciosos) observadas foram: desnutrição, malária, pneumonia e infecção por HIV. No entanto, em alguns casos teve crianças com mais de uma comorbidade (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Comorbidades associadas a casos de gastroenterites em crianças estudadas.

Comorbidade (N)	Faixa etária				Total (N = 123)
	0 - 6 meses (N = 23)	7 - 12 meses (N = 48)	13 - 24 meses (N = 42)	25 - 48 meses (N = 10)	
<b>HIV (17)</b>	17,4%	8,3%	16,7%	20,0%	13,8%
<b>Malária (29)</b>	17,4%	25,0%	21,4%	40,0%	23,6%
<b>Pneumonia (26)</b>	30,4%	14,6%	26,2%	10,0%	21,1%
<b>Desnutrição (37)</b>	17,4%	25,0%	45,2%	20,0%	30,1%

### Sinais e Sintomas

A Tabela 5.2 apresenta os sinais e sintomas observados com relação à faixa etária. Os sintomas e sinais observados foram febre, vômitos, sintomas respiratórios e desidratação. A febre foi o sinal mais frequente, com 90,2%, seguido de vômitos com 82,9%.

Tabela 5.2: Sinais e sintomas observados nas crianças estudadas.

<b>Sinais e Sintomas</b>	<b>Faixa etária</b>				<b>Total</b>
	<b>0 - 6 meses</b>	<b>7 - 12 meses</b>	<b>13 - 24 meses</b>	<b>25 - 48 meses</b>	
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>Febre</b>	95,7	85,4	92,9	90,0	90,2
<b>Vômito</b>	69,6	87,5	83,3	90,0	82,9
<b>Sintomas respiratórios*</b>	56,5	54,2	54,8	50,0	54,5
<b>Desidratação</b>	30,4	25,0	21,4	30,0	25,2

\*tosse, dificuldade de respirar, corriza.

### Tipo de Alimentação

Para esta variável, categorizou-se o tipo de alimentação em 3 grupos (somente leite materno, leite materno e outros e alimentação diversificada). Das 123 crianças, 52,8% (65/123) pertenciam ao grupo de alimentação diversificada, 38,2% (47/123) de leite materno e outros e apenas 8,9% (11/123) eram alimentadas somente de leite materno (Figura 5.4)



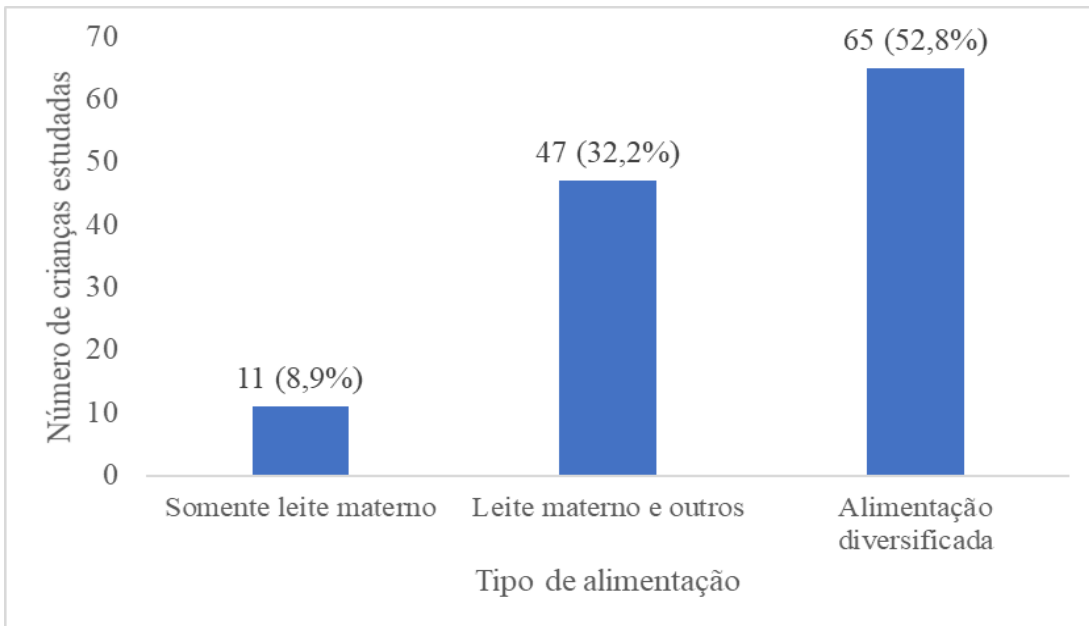


Figura 5.4: Distribuição dos 123 casos de diarreia aguda estudados em Maputo, 2012, por tipo de alimentação.

## 5.2. Detecção de RV, NoV e HAstV

A Figura 5.5 mostra a taxa de detecção de RV por PAGE/EIE, NoV e HAstV pela técnica de RT-PCR. A detecção geral dos agentes virais foi de 22% (27/123) nos casos estudados, sendo 10,6% NoV (n = 13), 8,1% HAstV (n = 10) e 3,3% RV-A (n = 4). As amostras de rotavírus detectadas por PAGE pertencem ao grupo A, não tendo se detectado outros grupos de RV.

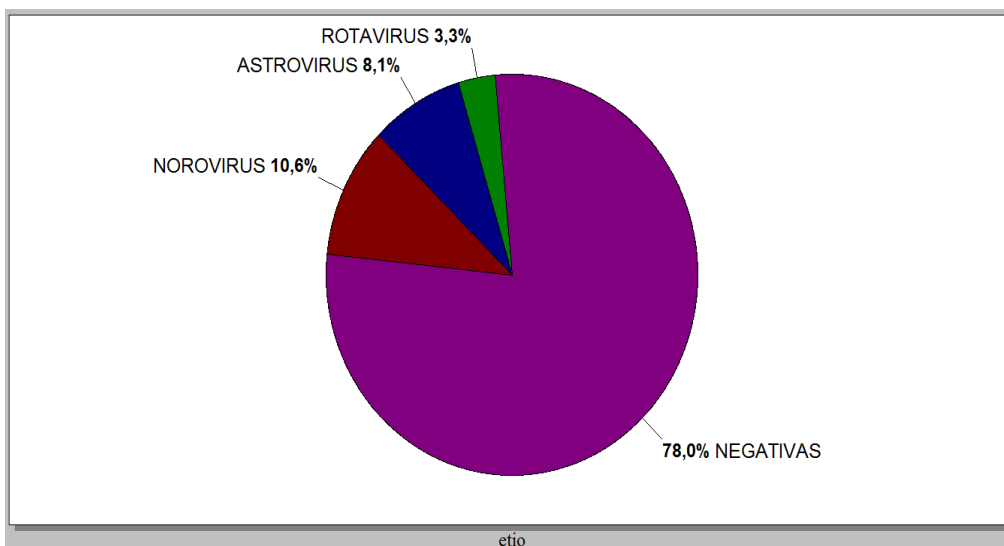


Figura 5.5: Detecção de RV-A, NoV e HAstV na população estudada.

As amostras positivas por PAGE para RV-A e os produtos amplificados pela técnica de RT-PCR das amostras positivas para NoV e HAstV estão apresentados nas Figuras 5.6 a 5.8.

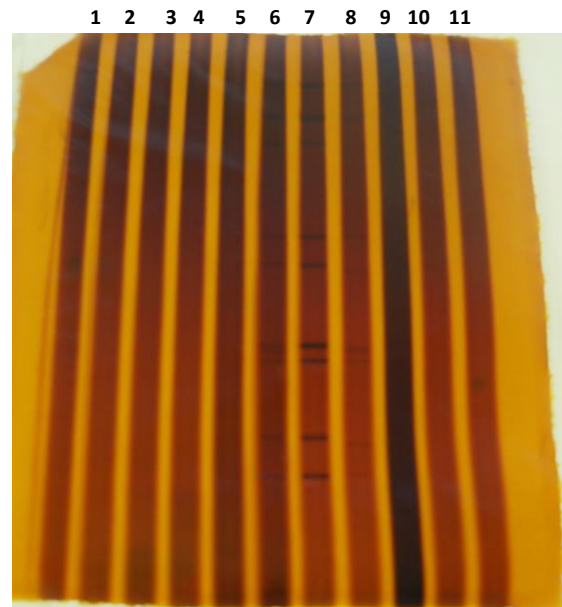


Figura 5.6: Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de RV.  
Linha 1: controle positivo para RV-A; Coluna 2 e 11: controles negativos para RV-A;  
Colunas 6, 7 e 8: amostras positivas para RV-A; Colunas 3, 4, 5, 9 e 10: amostras negativas para RV-A.

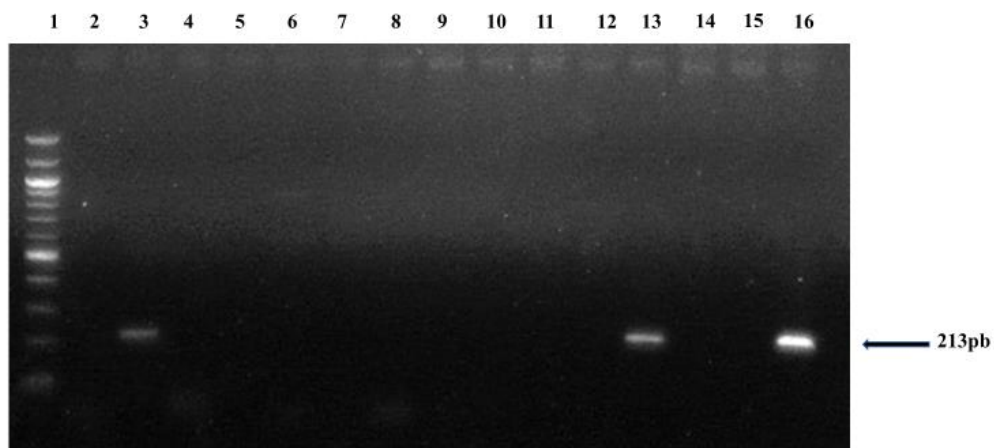


Figura 5.7: Eletroforese em gel de agarose para detecção de NoV.  
Coluna 1: marcador de 100 pb; Colunas 3 e 13: amostras positivas para NoV; Colunas 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12: amostras negativas para NoV; Coluna 15: controle negativo; Coluna 16: controle positivo. Iniciadores Mon 431, Mon 432, Mon 433 e Mon 434: 213pb.

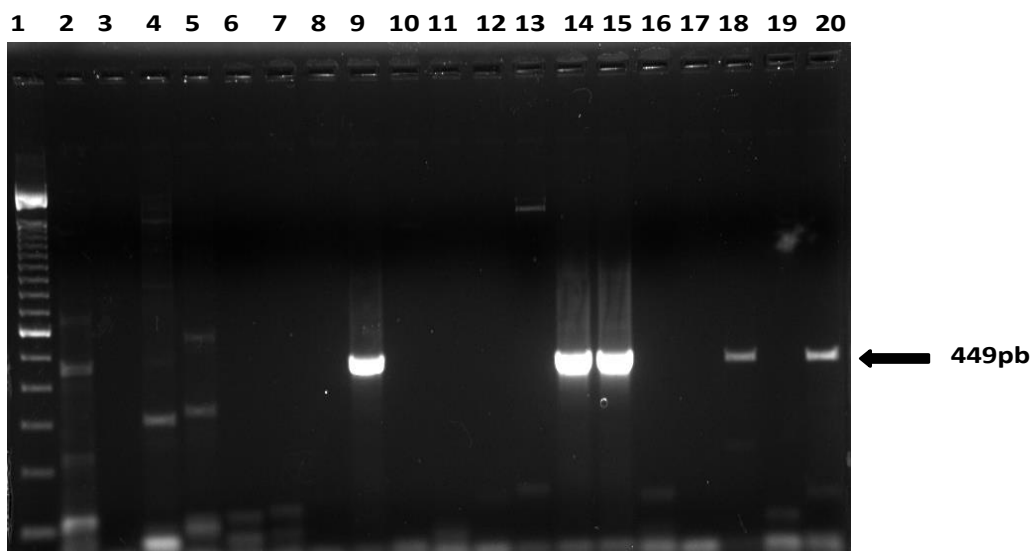


Figura 5.8: Eletroforese em gel de agarose para detecção de HAsV. Coluna 1: marcador de 100 pb; Colunas 2, 9, 14, 15 e 18: amostras positivas para HAsV; Colunas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 16 e 17: amostras negativas para HAsV; Coluna 19: controle negativo; Coluna 20: controle positivo. Iniciadores Mon 269 (+) e Mon 270 (-): 449pb.

### 5.3. Distribuição das infecções por RV-A, NoV e HAsV com base no tipo de alimentação

A Tabela 5.3 mostra as taxas de detecção de RV-A, NoV e HAsV com relação ao tipo de alimentação. Os tipos de alimentação das crianças em estudo foram divididos em três categorias (somente leite materno, leite materno/outros e outros alimentos). O RV-A foi detectado nas três categorias de alimentação, incluindo crianças alimentadas somente com leite materno. Os NoV apresentaram a mesma distribuição. Os HAsV não foram detectados em crianças alimentadas somente com leite materno.

Tabela 5.3: Distribuição das infecções por RV-A, NoV e HAstV com base no tipo de alimentação.

<b>Alimentação</b>	<b>Vírus</b>		
	<b>RV-A (%)</b>	<b>NoV (%)</b>	<b>HAstV (%)</b>
Somente leite materno	1/11 (9,1)	2/11 (18,2)	0/11
Leite materno e outros	2/47 (4,3)	6/47 (12,8)	3/47 (6,4)
Outros alimentos*	1/65 (1,5)	5/65 (7,7)	7/65 (10,8)

\*Alimentação diversificada que não inclui leite materno

#### 5.4. Sinais e sintomas associados às infecções por RV-A, NoV e HAstV

Os sinais e sintomas associados a infecção por vírus gastroentéricos, além da diarreia, foram vômitos (85,2%), febre (81,5%), sintomas respiratórios (51,9%) e desidratação (25,9%) (Tabela 5.4).

Tabela 5.4: Sinais e sintomas observadas nas infecções por RV-A, NoV e HAstV na população estudada.

<b>Sinais e Sintomas*</b>	<b>RV-A</b>	<b>NoV</b>	<b>HAstV</b>	<b>Total</b>
<b>Febre</b>	2/4 (50%)	12/13 (92,3%)	8/10 (80%)	22/27 (81,5%)
<b>Vômito</b>	3/4 (75%)	12/13 (92,3%)	8/10 (80%)	23/27 (85,2%)
<b>Sintomas respiratórios**</b>	2/4 (50%)	10/13 (76,9%)	2/10 (20%)	14/27 (51,9%)
<b>Desidratação</b>	1/4 (25%)	5/13 (38,5%)	1/10 (10%)	7/27 (25,9%)

\*Todas crianças que participaram do estudo tinham diarreia, tendo sido utilizada como critério de inclusão; \*\*tosse, dificuldade de respirar, corriza.

#### 5.5. Distribuição das infecções por RV-A, NoV e HAstV com base na faixa etária

Os agentes virais foram detectados em todas as faixas etárias. No entanto, a maior taxa de detecção dos patógenos pesquisados foi de 34,7% (8/23), em crianças de 0 aos 6 meses. Analisando separadamente os vírus pesquisados, o RV-A foi detectado com maior frequência em crianças de 0 a 6 meses (8,7%; 2/23), sendo os NoV também mais frequentemente detectados na mesma faixa dos 0 a 6 meses (21,7%; 5/23). Os HAstV foram detectados com maior frequência na faixa de 12 a 24 meses e 25 a 48 meses com 9,5% (4/42) e 10% (1/10), respectivamente, como observado na Figura 5.9.

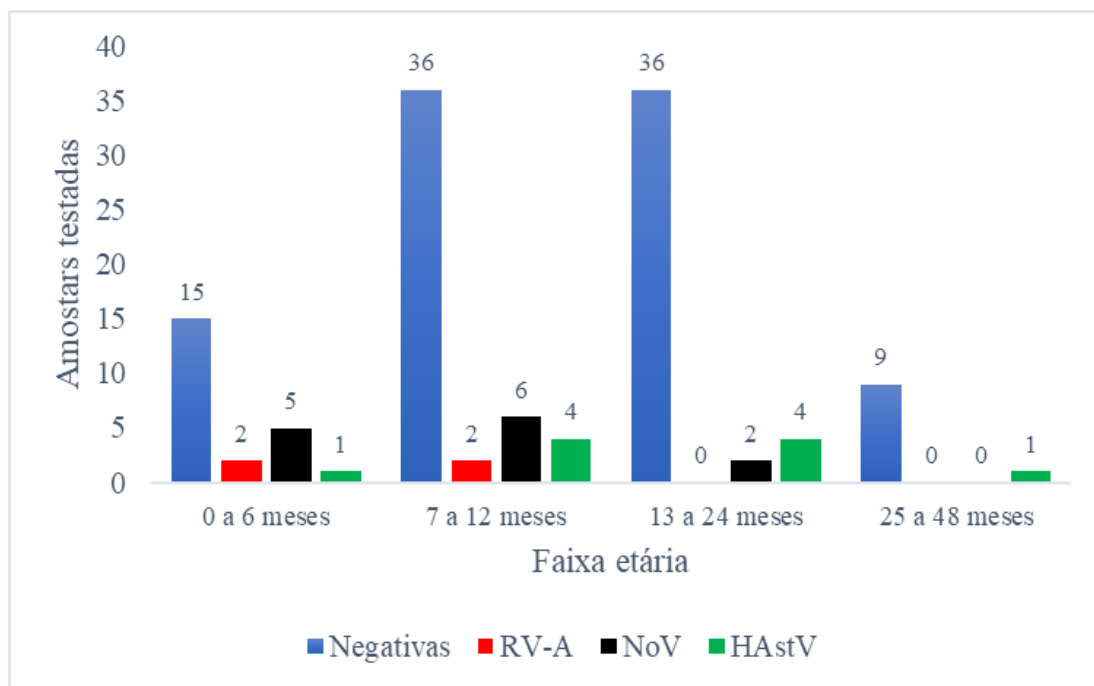


Figura 5.9: Número de casos de RV-A, NoV e HAstV com base na faixa etária.

### 5.6. Distribuição das infecções por RV-A, NoV e HAstV com base na comorbidade

As comorbidades associadas à hospitalização por diarreia aguda e à infecção por RV-A, NoV e HAstV durante o período do estudo foram as seguintes: malária, infecção por HIV, pneumonia e desnutrição. As infecções causadas por RV-A foram detectadas em quase todas as comorbidades, a exceção foi em crianças com pneumonia. A maior taxa de detecção foi observada em crianças com HIV (5,9%) (Tabela 5.5).

As infecções causadas por NoV e HAstV foram detectadas nas quatro comorbidades. A infecção por NoV foi maior em crianças com pneumonia (15,4%). A maior frequência de HAstV foi em crianças infectadas por HIV (11,8%) e desnutridos (11,7%) (Tabela 5.5).

Tabela 5.5: Distribuição das infecções por RV-A, NoV e HAstV com base na comorbidade.

Comorbidade	Vírus		
	RV-A (%)	HAstV (%)	NoV (%)
<b>Malária</b>	1/29 (3,3)	1/29 (3,3)	2/29 (6,9)
<b>Infecção por HIV</b>	1/17 (5,9)	2/17 (11,8)	1/17 (5,9)
<b>Pneumonia</b>	0/26	1/26 (3,8)	4/26 (15,4)
<b>Desnutrição</b>	1/37 (2,7)	4/37 (11,7)	3/37 (8,8)
<b>Sem comorbidade</b>	1/35 (2,8)	2/35 (5,7)	3/35 (8,5)

### 5.7. Genotipagem de RV-A

A genotipagem foi realizada em três amostras das quatro que foram positivas no EIE/PAGE. Não foi possível genotipar uma amostra, pois esta teve sua amplificação negativa para P-tipo (VP4) e G-tipo (VP7).

A genotipagem de VP4 (P-tipo) foi realizada através da semi-*nested* PCR multiplex (Figura 5.10 e 5.11). Para genotipagem/caracterização molecular de VP7 (G-tipo) foi necessária a realização do sequenciamento parcial do gene que codifica a proteína VP7 a partir do produto da primeira PCR (Figura 5.12). A caracterização molecular das três amostras demonstrou as seguintes combinações G/P: duas G12P[6] e uma G12P[8] (Tabela 5.6).

Tabela 5.6: Número de registro das amostras no LVCA, mês da coleta e os respectivos genótipos VP7 (G-tipo) e VP4 (P-tipo).

Amostras	Mês	VP7 (G-tipo)	VP4 (P-tipo)	Combinação G/P
20772	Novembro	G12	P[6]	G12P[6]
20808	Dezembro	G12	P[6]	G12P[6]
20811	Dezembro	G12	P[8]	G12P[8]

A seguir os produtos da PCR em gel de agarose para caracterização molecular de RV-A.

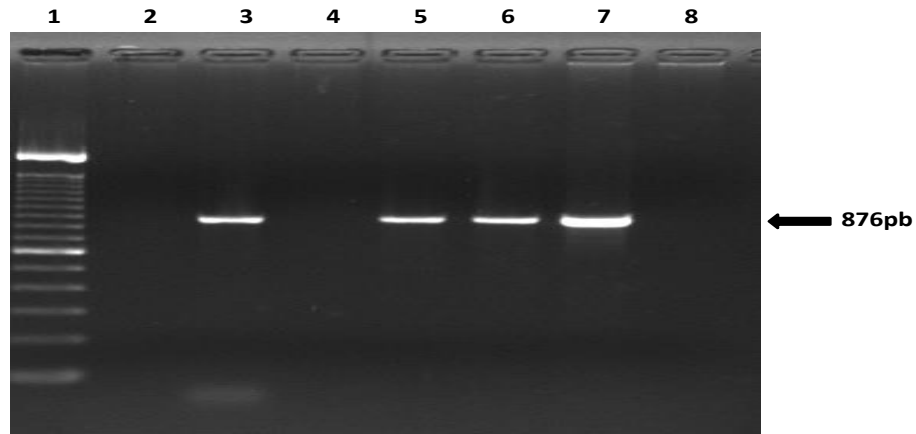


Figura 5.10: Eletroforese em gel de agarose para identificação de RV-A VP4. Coluna 1: marcador de 100 pb; Colunas 2 e 4: amostras negativas para RV-A (VP4); Colunas 3, 5 e 6: amostras positivas para RV-A (VP4); Coluna 7: controle positivo; Coluna 8: controle negativo. Iniciadores 4con2 + 4con3: 876pb.

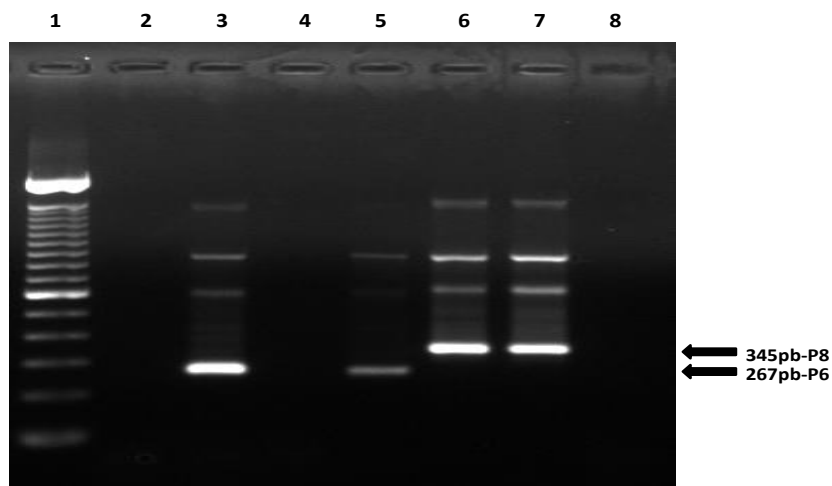


Figura 5.11: Eletroforese em gel de agarose para caracterização molecular da VP4. Coluna 1: marcador de 100 pb; Colunas 2 e 4: amostras negativas; Colunas 3 e 5: amostras positivas P[6]; Coluna 6: amostras positivas P[8]; Coluna 7: controle positivo P[8]; Coluna 8: controle negativo. Iniciadores 3T-1 / P[6]: 267pb, 1T-1VN / P[8], 1T-1Wa / P[8] e 1T-1 / P[8]: 345pb.

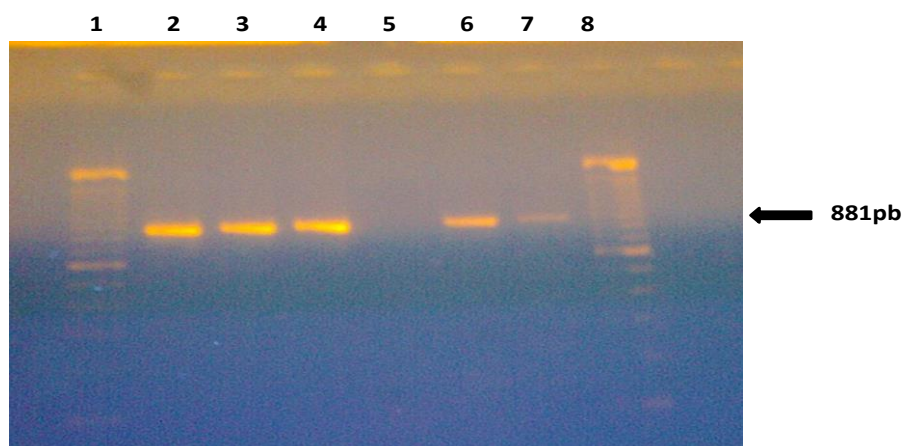


Figura 5.12: Eletroforese em gel de agarose para detecção de RV-A VP7. Colunas 1 e 8: marcadores de 100 pb; Colunas 2, 3 e 4: amostras positivas para RV-A (VP7); Coluna 5: controle negativo; Colunas 6 e 7: controles positivos. Iniciadores VP7-F + VP7-Rged: 881pb.

### 5.8. Análise de Sequências

A figura 5.13, mostra um dendograma baseada na análise do gene VP7 das três amostras sequenciadas neste estudo, incluindo os protótipos que apresentaram elevado percentual de identidade nucleotídica. Foram observados dois agrupamentos distintos, no grupo A duas amostras do presente estudo relacionaram-se com amostras protótipos G12P[6] isoladas na Índia, revelando uma similaridade de 85% e de 100% entre elas. No grupo B, uma amostra agrupou com protótipos G12P[8], e apresentou similaridade de 70% com um isolado da Argentina.

As amostras sequenciadas apresentam uma matriz de identidade nucleotídica elevada com as amostras protótipos da Índia [mani-485/08 G12P[6], ISO129 (G12) e ISO16 (G12)] com percentagem de similaridade que variou de 96,7 a 98,9% (Tabela 5.7).



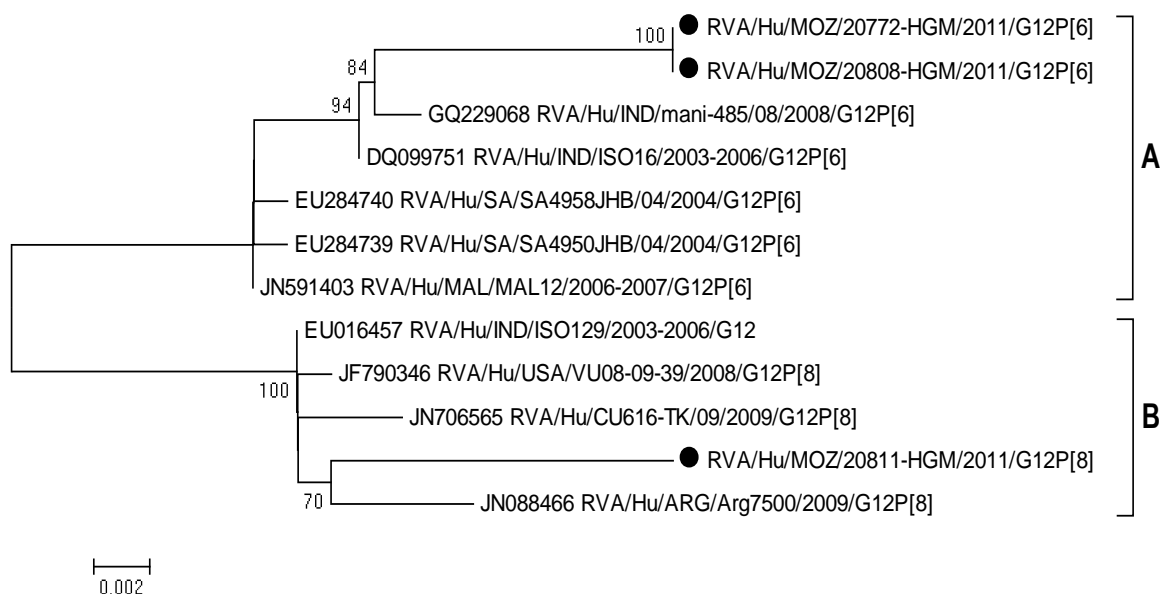


Figura 5.13: Dendrograma obtida a partir das análises das sequências nucleotídicas do segmento que codifica para a VP7, valores de bootstrap abaixo de 70% não foram mostrados. As amostras sequenciadas neste trabalho estão destacadas com o símbolo (●).

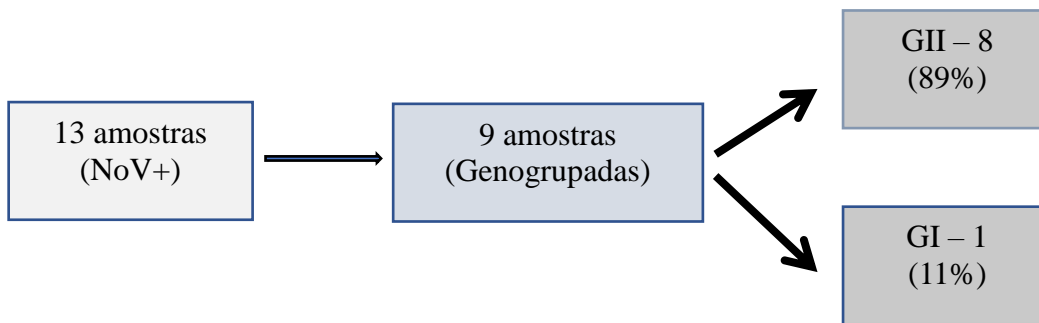
Tabela 5.7: Percentagem de identidade nucleotídica\* e aminoacídica\* entre as sequências das amostras em estudo e os principais protótipos utilizados na análise.

ID Amostra	20772-HGM/2011	20808-HGM/2011	20811-HGM/2011	ISO16	ISO129	mani-485/08	Arg7500/Arg/2009
20772-HGM/2011	x	100	88,2	97,2	90,9	96,4	89,8
20808-HGM/2011	100	x	88,2	97,2	90,9	96,4	89,8
20811-HGM/2011	95,4	95,4	x	90,9	96,8	90,9	96,4
ISO16 (G12)	98,9	98,9	96,4	x	93,7	99,2	92,5
ISO129 (G12)	96,7	96,7	98,6	97,8	x	92,9	98,8
mani-485/08 (G12P[6])	98,7	98,7	96,4	99,7	97,5	x	91,7
Arg7500/Arg/2009 (G12P[8])	96,1	96,1	98,2	97,2	99,3	96,9	x

\*A percentagem de identidade de aminoácidos e nucleotídeos está abaixo e acima da diagonal, respectivamente.

### 5.9. Genogrupagem de NoV

Das 13 amostras positivas para NoV pela região B, apenas 62,2% (9/13) amplificaram pela região D. Nas 9 amostras que foi possível genogrupar, o GII foi o mais frequente com 89% (8/9) em relação ao GI (11%), como ilustra o diagrama.



A seguir os produtos da PCR em gel de agarose para genogrupagem de NoV.

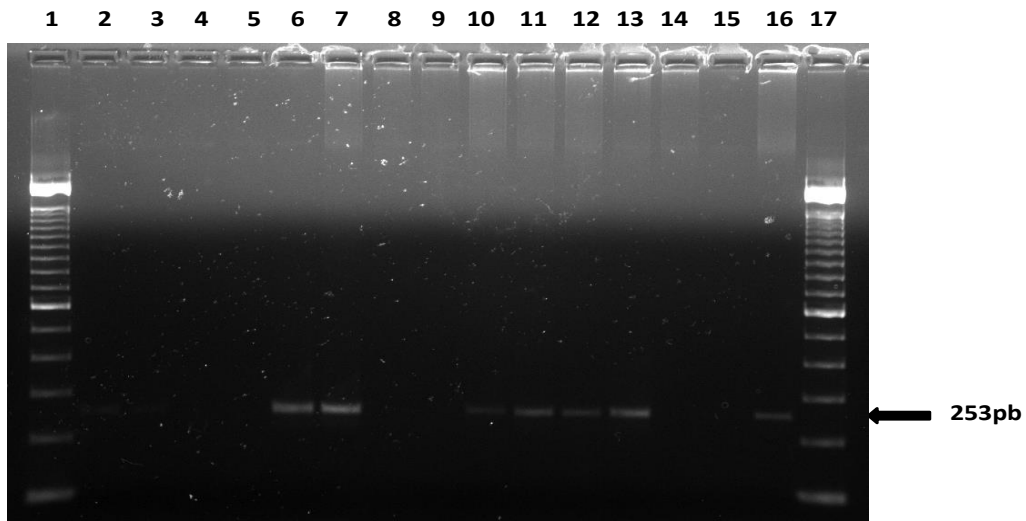


Figura 5.14: Eletroforese em gel de agarose para detecção de NoV (GII).

Coluna 1 e 17: marcadores de 100 pb; Colunas 2, 3, 6, 7, 10, 11, 12 e 13: amostras positivas para NoV GII; Colunas 4, 5, 8, 9 e 14: amostras negativas para NoV GII; Coluna 15: controle negativo; Coluna 16: controle positivo. Iniciadores Cap C (-) e Cap D1 (+): 253pb.

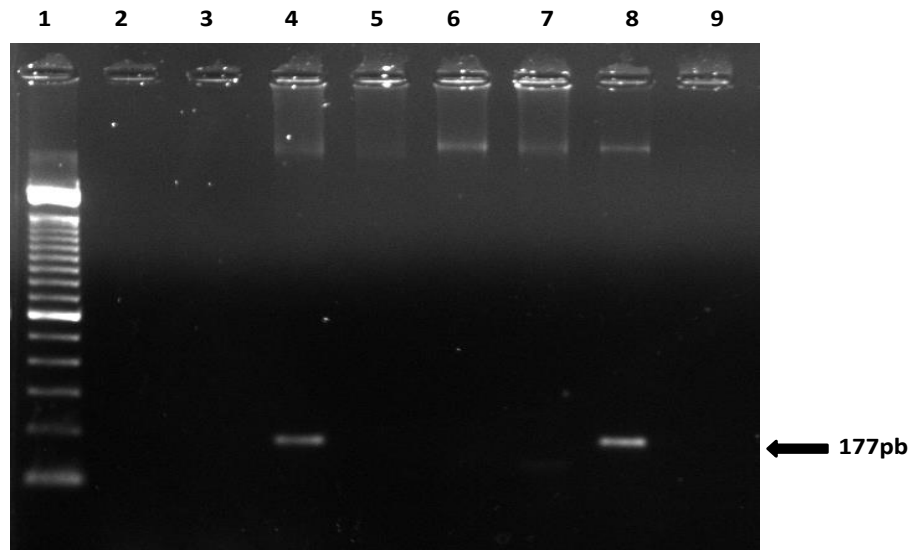


Figura 5.15: Eletroforese em gel de agarose para detecção de NoV (GI). Coluna 1: marcador de 100 pb; Coluna 4: amostra positiva para NoV GI; Colunas 2, 3, 5 e 6: amostras negativas para NoV GII; Coluna 7: controle negativo; Coluna 8: controle positivo. Iniciadores Cap A (-), Cap B2 (+) e Cap B1 (+): 177pb.

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo estudar as diarreias agudas causadas por RV-A, NoV e HAstV no período de novembro de 2011 a fevereiro de 2012 em um hospital da cidade de Maputo. O trabalho fornece dados importantes em relação a circulação de vírus gastroentéricos em Moçambique.

Muitos estudos realizados em diferentes partes do mundo têm demonstrado a importância dos RV-A, NoV e HAstV como principais causas de internações em crianças menores de 5 anos com diarreia (Bereciartu et al, 2002; Silva et al, 2008; Kittigul et al, 2009; Kamel et al, 2009; Cunliffe et al, 2010).

A combinação de diagnóstico rápido, tratamento adequado e medidas adequadas de higiene, é o principal alvo no controle das diarreias causadas por vírus. Neste trabalho, apresentamos conhecimentos e métodos laboratoriais adequados para a implantação do diagnóstico de diarreias causadas por vírus em Moçambique.

Em Moçambique existem poucos dados nesta área de pesquisa e os poucos que existem, até então, limitam-se à detecção de RV-A, não fornecendo dados em relação aos genótipos circulantes (Hung et al, 1994 e Mandomando et al, 2007). Em relação a circulação de NoV e HAstV, ainda não existem dados disponíveis, sendo este o primeiro estudo que demonstra a importância destes vírus no país.

Os vírus gastroentéricos foram detectados em todos os quatro meses do estudo, com uma frequência geral de 22%. A frequência de detecção encontrada é similar aquela observada em alguns estudos realizados na Argentina, Tailândia, Egito e Malawi, que variou de 14.9% a 59% (Bereciartu et al, 2002; Kittigul et al, 2009; Kamel et al, 2009; Cunliffe et al, 2010). As taxas de detecção de RV-A, NoV e HAstV observadas neste estudo demonstram que estes três vírus são responsáveis por aproximadamente ¼ das hospitalizações por diarreia no HGM na cidade de Maputo.

Como tem sido documentado em várias partes do mundo, neste estudo a maioria das crianças estudadas (92%) tinham menos de dois anos de idade, o que destaca a importância das diarreias nesta faixa etária, corroborando os dados de infecção por vírus gastroentéricos que apresentaram maior frequência (mais de 96%) na mesma faixa etária. Resultados similares foram obtidos tanto em países tropicais como Brasil (Carvalho-Costa et al, 2006; Victória et al, 2007) e em países da África Austral tais como África do Sul (Potgieter et al, 2010) e Malawi (Cunliffe et al, 2010).

Alguns estudos realizados em países africanos (Ghana e Egito) demonstram a importância de RV-A em crianças menores de cinco anos, sendo que a frequência de detecção tem sido maior quando comparada a outros agentes causadores da diarreia infantil (NoV ou HAstV) (Siva et al, 2008; Kamel et al, 2009). Neste estudo, a detecção de RV-A foi a primeira opção de diagnóstico. As amostras negativas para RV-A foram testadas para NoV e, por último, as amostras negativas para RV-A e NoV foram testadas para HAstV. Limitou-se, deste modo, a detecção de casos de co-infecção e possivelmente tenha se subestimado a real taxa de NoV e HAstV.

Os NoV tiveram a taxa de detecção mais alta (10,6%; 13/123) e o RV-A a menor (3,3%; 4/123). Achados similares com a maior frequência de NoV foram descritos na Tailândia por Kittigul e colaboradores (2009) e na Espanha por Gonzalez-Galan e colaboradores (2011) onde a taxa de detecção de NoV foi de 6,5% e 27%, contra os 6,1% e 21% de RV-A, respectivamente.

De uma forma geral, a taxa de infecção por RV-A é similar nos países em desenvolvimento e nos países desenvolvidos, contudo, a mortalidade é elevada nos países em desenvolvimento onde o acesso ao tratamento é limitado e os factores de risco para a gravidade da doença, como é o caso da desnutrição associado ao HIV, são elevados (Chandran et al, 2010).

A frequência de RV-A (3,3%) observada no presente estudo é superior quando comparada a um estudo realizado recentemente em um hospital rural da província de Maputo por Mandomando e colaboradores (2007), que obtiveram uma frequência de 0,6% através da utilização de um teste de aglutinação de latex. Estes autores estudaram a etiologia da doença diarreica em crianças menores de 5 anos de idade (n = 529) durante um período de um ano. Em contrapartida, estudos realizados em países vizinhos (África do Sul, Zâmbia, Zimbabué, Tanzania e Malawi) demonstram uma alta prevalência, que variou de 18 a 38% (Moyo et al, 2007; Waggie et al, 2010; Seheri et al, 2010).

A baixa frequência de detecção de RV-A pode ser explicada pelo período de coleta das amostras (novembro a fevereiro) e pela possível sazonalidade do vírus. Nos países tropicais, como é o caso de Moçambique, o RV-A tem sido detectado ao longo do ano. Contudo, alguns estudos realizados em países tropicais mostraram que no período de primavera-verão a taxa de detecção de RV-A cai para 15%, atingindo 25% em média no período de outono-inverno (Levi et al, 2009; Carvalho-Costa et al, 2011). O curto período da coleta pode ter influenciado na baixa taxa de detecção, havendo

deste modo, a necessidade de realizar-se estudos com a distribuição anual das amostras para determinar a distribuição dos RV-A ao longo do ano.

Entretanto, o percentual encontrado neste estudo (3.3%) continua abaixo da média para o período de verão, sugerindo que outros fatores podem ter contribuído para tal, como por exemplo, a presença de comorbidades na maioria das crianças hospitalizadas com diarreia aguda. Neste estudo, 61% dos participantes tinham pelo menos uma comorbidade (malária, HIV, desnutrição, pneumonia). Estudos têm mostrado a importância destas comorbidades na indução da diarreia. Wilcox e colaboradores (1999) observaram que 20% dos pacientes com HIV tinham hipocloridria que é caracterizada por uma diminuição na secreção de ácido clorídrico no estômago levando à inflamação, má digestão, distensão abdominal, diarreia, diminuição na absorção de ácido fólico e zinco, sintomas/sinais semelhantes a uma infecção gastroentérica. Em outro estudo realizado com objetivo de avaliar a segurança e a tolerância de duas drogas anti-maláricas em crianças entre 4 e 22 meses em Uganda, eventos adversos como diarreia e vômitos foram observados, contudo, estes eventos não estavam relacionados aos anti-maláricos em uso no estudo, mas sim, possivelmente ao próprio quadro de malária (Katrak et al, 2009).

Segundo Chandran e colaboradores (2010), a desnutrição aumenta a susceptibilidade das crianças às infecções gastrointestinais e a diarreia, por sua vez, provoca uma diminuição na absorção de sais, carboidratos e água, o que agrava o estado nutricional das crianças. Como resultado, 61% das crianças que morrem de diarreia têm desnutrição como um fator de risco adjacente (Chandran et al, 2010). Segundo os últimos dados apresentados pelo MICS (2008), a prevalência da desnutrição infantil, especialmente de desnutrição crônica, continua muito alta em Moçambique segundo a classificação da OMS que considera taxas acima de 40% muito elevadas. As taxas de desnutrição crônica variam de 25% a 56% entre as províncias moçambicanas sendo que Maputo-Cidade, local onde foi realizado o estudo, tem a menor taxa do país (25%) (MICS, 2008). Entre as crianças estudadas, a taxa de desnutrição foi de 30,1%, com um aumento de até 45,2% em crianças de 13 a 24 meses. A desnutrição associada à diarreia compromete o desenvolvimento físico, motor e cognitivo, o que afeta negativamente as crianças ao longo das suas vidas (MICS, 2008). Desta forma, o suporte nutricional é um componente crítico para atenuar os resultados a curto e longo prazo da infecção por RV-A bem como por outros agentes etiológicos da diarreia. Importa realçar que neste estudo não foram pesquisados outros agentes etiológicos como bactérias ou protozoários.

A outra medida que poderia minimizar os efeitos da diarreia infantil seria a introdução da vacina contra RV-A no país. Em 2009, a OMS recomendou a introdução da vacina contra RV-A em todos os países, principalmente naqueles onde a mortalidade infantil (crianças menores de cinco anos) por diarreia é superior a 10%. A introdução da vacina contra RV-A (monovalente ou pentavalente) tem demonstrado um impacto sobre a morbi-mortalidade associada às doenças diarreicas, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. Acredita-se que a introdução da vacina contra RV-A, em nível mundial, pode evitar mais de 160 mil mortes anuais (Chandran et al, 2010).

Vários estudos têm sido realizados em países africanos para avaliar a eficácia da vacina, estes estudos mostram que a eficácia da vacina varia de um país para o outro, sendo baixa nos países em desenvolvimento/condição sócio-econômica desfavorecida. Madhi colaboradores (2010), realizaram um estudo em 3166 crianças sul-africanas e 1773 malawianas para avaliar a eficácia da vacina monovalente Rotarix<sup>®</sup>. Em crianças sul africanas a vacina reduziu em 76,9% a ocorrência de casos graves de gastroenterites por RV-A e em 44,1% a incidência de todos os casos de gastroenterite. No entanto, em Malawi a eficácia foi baixa, sendo apenas de 49,4% para os casos de gastroenterites grave por RV-A. A diferença da eficácia observada nos dois países pode ser explicada pela diferença dos genótipos que circulam em cada um deles. Dois anos mais tarde, outro estudo prospectivo foi realizado na África do Sul (Madhi et al, 2012). Este estudo randômico incluiu 1339 crianças que foram acompanhadas por um período de dois anos; os participantes foram divididos em três grupos (447 foram administradas duas doses de Rotarix<sup>®</sup>, 447 três doses e 445 placebos). Durante o período do estudo observou-se que a eficácia de Rotarix foi de 59%, sendo que uma boa eficácia (85%) foi observada no grupo que tomou três doses comparativamente ao grupo que tomou duas doses (32%). Estes resultados apontam para a necessidade da introdução da vacina na maior parte dos países africanos onde a mortalidade por diarreia tem sido alta. Contudo, uma revisão em relação às doses ideais nestes países deve ser observada, uma vez que a melhor eficácia foi demonstrada no grupo onde foram administradas três doses.

Em 2010, a cobertura vacinal global para RV-A foi estimada em apenas 6%. Muitos países, especialmente os de África e Sudeste Asiático não atingiram os objetivos da *Global Immunization Vision and Strategy* (GIVS) (WHO, 2012).

Tem sido avaliada a relação custo-benefício da introdução da vacina pentavalente e monovalente em Ghana (Abbout et al, 2012) e Malawi (Berry et al,

2010), respectivamente. No estudo realizado em Ghana, conclui-se que a introdução da vacina pentavalente seria vantajosa, uma vez que evitaria 1.554 óbitos e reduziria os gastos em tratamento da diarreia infantil naquele país. Em Malawi, observou-se que, com uma eficácia de 49,5%, haveria uma redução de 2.582 óbitos e de gasto em U\$74,73 dólares em cada caso.

De uma forma geral, os estudos realizados em países africanos mostram a importância e as vantagens da introdução da vacina (monovalente/pentavalente) contra RV-A (Arvay et al, 2009; Armah et al, 2010; Soares-Weiser et al, 2012). Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo como a baixa taxa de detecção de RV-A e a ocorrência de apenas um genótipo, G12, não suportam a introdução da vacina em Moçambique, pelo menos por enquanto, no entanto, mais estudos devem ser realizados a nível nacional para identificar os genótipos circulantes e o peso da diarreia por RV-A no país.

Quanto à alimentação, acredita-se que o aleitamento materno seja uma estratégia eficaz na prevenção da morbidade e mortalidade infantil, pois este contém nutrientes e células (lactederina, IgA secretora, linfócitos T e B) que protegem o epitélio intestinal contra agentes patogênicos (Jiang et al, 2004; Makita et al, 2007). O aleitamento materno pode evitar até 1,45 milhões de óbitos nos países em desenvolvimento (Wobudeya et al, 2011). Na África, Ásia, América Latina e Caribe somente 47 a 57% das crianças com menos de dois meses e 25 a 31% com 2 a 5 meses têm aleitamento materno exclusivo (Black et al, 2008). Em Moçambique a amamentação exclusiva é recomendada para crianças dos zero aos seis meses. Somente 37% de crianças dos zero aos seis meses e 48% de crianças de zero a três meses são amamentadas exclusivamente (MICS, 2008). Onze crianças do estudo pertencem ao grupo de crianças alimentadas somente com leite materno, e 27% (3/11) tiveram infecções por gastroenterites de etiologia viral, sendo que uma infecção foi por RV-A e duas por NoV, não tendo sido detectados casos de HAsV neste grupo. A não detecção de HAsV no grupo amamentado exclusivamente sugere que o aleitamento materno pode ter protegido este grupo contra infecção por HAsV. Muitos estudos realizados têm fornecido resultados divergentes em relação ao papel do aleitamento materno na prevenção da diarreia, principalmente a diarreia causada por RV-A (Linhares et al, 1989; Naficy et al, 1999; Asensi et al, 2006; Plenge-Boarning et al, 2010; Wobudeya et al, 2011).

A taxa de detecção de NoV (10,6%) observada neste estudo está dentro da faixa de detecção que varia de 6,5% a 26% (Kittigul et al, 2009; Kamel et al, 2009). Os NoV



foram detectados apenas em crianças com idade menor ou igual 24 meses de idade, contudo, foi maior na faixas etárias de 0 a 6 meses (21,7%) seguida de 7 a 12 meses. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos no Brasil (Victória et al, 2007; Ferreira et al, 2010) em estudos de vigilância em crianças hospitalizadas. O mesmo padrão da infecção por NoV apenas em crianças com menos de 2 anos de idade foi observado em alguns estudos de países da África Austral, África do Sul (Mans et al, 2010) e Botswana (Mattison et al, 2010).

A baixa detecção de NoV observada neste estudo em crianças acima de um ano de idade e a não detecção em crianças com mais de 2 anos podem estar relacionadas com a imunidade protetora desenvolvida após a exposição precoce do NoV, uma vez que os níveis de anticorpos anti-norovírus são mais baixos durante o primeiro ano de vida e aumentam após dois anos (Lew et al, 1994).

Dos cinco genogrupos de NoV, dois (GI e GII) são relevantes para o homem, sendo que o GII tem sido detectado em taxa elevada comparativamente ao GI. Este padrão têm sido observado em vários estudos realizados no mundo (Silva et al, 2008; Ferreira et al, 2010; Mans et al, 2010; Mattison et al, 2010). As treze amostras positivas para NoV neste estudo foram submetidas a genogrupagem pela região D. Entre as nove amostras que amplificaram pela região D, oito pertencem a GII e uma a GI, corroborando os resultados já descritos anteriormente (Silva et al, 2008; Ferreira et al, 2010; Mans et al, 2010; Mattison et al, 2010).

Em relação à HAstV, a taxa de detecção foi de 8,1%. Estes resultados estão dentro da faixa de detecção de 2,7% em Botswana (Basu et al, 2003) e 13,5% no Brasil (Victória et al, 2007). Esta taxa de detecção foi superior em relação a de RV-A (3,3%) demonstrando a importância de HAstV como segunda maior causa de hospitalizações por gastroenterites de etiologia viral neste estudo.

Os HAstV foram detectados em todas faixas etárias, com maior frequência na faixa de 13 - 24 meses. Estudos demonstram que a infecção por HAstV ocorrem principalmente em crianças com menos de dois anos de idade (Gabbay et al, 2007; Victória et al, 2007; Pang e Vesikari, 1999). Entretanto, em um estudo realizado na Espanha durante um período de três anos, o pico de detecção de HAstV no mesmo grupo foi em crianças com 2 a 4 anos (Guix et al, 2002). Estes dados sugerem que a distribuição da infecção por HAstV por faixa etária pode variar dependendo da região geográfica.

A caracterização molecular dos RV-A em crianças com diarreia aguda é considerada importante para a introdução da vacina anti-rotavírus. Neste trabalho, a genotipagem de RV-A foi realizada com base no sequenciamento da VP7 para G-tipo e semi-*nested* PCR para VP4 (P-tipo).

Estudos realizados em várias partes do mundo demonstram a combinação G1P[8] como a predominante no mundo, representando 64,7%. Em contrapartida, no continente africano, esta combinação representa apenas 23%, e as combinações consideradas incomuns (não muitos frequentes) representavam 27% dos casos (Santos e Hoshino, 2005). Estudos recentes realizados em Ghana, Malawi e África do Sul demonstram a predominância e importância do G1P[8] em casos de diarreia por RV-A (Silva et al, 2008; Cunliffe et al, 2010; Seheri et al, 2010).

Neste estudo, apenas o genótipo G12 foi identificado nas amostras positivas para RV-A (G-tipo). E as combinações G/P observadas neste estudo foi de G12P[6] para duas amostras e G12P[8] para uma amostra. Duas amostras (20772 e 20808) identificadas como G12 neste estudo tiveram identidade nucleotídica de 98,7 e 98,9% com os isolados da Índia com número de acesso GQ229068 (mani-485/08) e DQ099751 (ISO16), respectivamente (Samajdar et al, 2006; Mukherjee et al, 2010). As amostras 29772 e 20808 tiveram uma similaridade nucleotídica de 100% entre elas. A terceira (20811) amostra teve uma identidade de 98,6% quando comparada a outro rotavírus G12 isolado também da Índia, com número de acesso EU016457 (ISO129) (Samajdar et al, 2006). A amostra 20772 foi obtida em novembro e era proveniente do bairro de Hulene; as 20808 e 20811 foram colhidas em dezembro e eram de Maxaquene, sugerindo que os três casos foram isolados.

A primeira descrição de G12 foi em amostras de 20 crianças menores de 2 anos, obtidas no período de 1987 a 1988 nas Filipinas (Taniguchi et al, 1990). Anos mais tarde foram detectados nos Estados Unidos, Tailândia, Índia, Argentina (Santos e Hoshino, 2005).

Estudos realizados em alguns países vizinhos têm demonstrado a ocorrência de G12 na África Austral. Sehere et al (2010), observaram a ocorrência de G12, com baixa frequência, em amostras obtidas de 2003 a 2006 na África do Sul. Ao contrário, em um estudo realizado, no mesmo país, em 111 positivas para RV-A obtidas no período de 1998 a 2000, não se detectou G12 (Potgier et al, 2010). O primeiro estudo sugere a emergência ou introdução de G12 naquele país.

Uma análise de amostras obtidas de 1997 a 2007 em Malawi detectou a combinação G/P de G12P[6] e G12P[8] (como observado no nosso estudo), em amostras colhidas de 2005 a 2007 (Cunliffe et al, 2010). Acredita-se que a emergência de G12 naquele país seja rearranjo com outras estirpes circulantes.

Em um outro estudo realizado em Ghana (país africano), observou-se a ocorrência de 5,6% de G12P[8], contudo, o genótipo G1P[8] foi o mais detectado com 80% (Silva et al, 2008), sugerindo que a frequência dos genótipos circulantes podem variar de um país para o outro.

A detecção de G12 no presente trabalho ilustra a emergência de G12 na região Austral de África, este resultado sugere que G12 pode ter sido introduzido no país a partir da Índia uma vez que a imigração dos outros povos para o país têm papel importante na diversidade dos genótipos de RV-A.

Este trabalho contribui com uma nova abordagem laboratorial e os dados obtidos demonstram a circulação dos vírus gastroentéricos em Moçambique. Os resultados aqui encontrados mostram a importância e urgência na implantação de um sistema de vigilância ativa para diagnóstico das doenças diarréicas em Moçambique.

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ A frequência geral de doenças diarréicas por vírus foi de 22% durante o período do estudo, sendo que o NoV foi detectado em 10,6%, seguida de HAstV 8,1% e 3,3% de RV-A;
- ✓ As combinações G/P observadas foram: G12P[6] e G12P[8];
- ✓ A amplificação da região D do capsídeo VP1 dos NoV demonstrou maior frequência GII em relação ao GI (89% e 11% , respectivamente).
- ✓ As infecções por RV-A e NoV foram detectadas com maior frequência na faixa de 0 a 6 meses.
- ✓ A infecção por HAstV foi observada em todas faixas etárias, com maior frequência na faixa de 13 a 24 meses.
- ✓ A infecção por RV-A e NoV foi frequente em crianças com aleitamento materno exclusivo e o HAstV não foi detectado nestas crianças.
- ✓ A elevada taxa de comorbidades (malária, infecções respiratórias agudas, infecção pelo HIV e desnutrição proteico-calórica) pode ter influenciado a frequência dos agentes virais entre as crianças hospitalizadas com doenças diarréicas no período de estudo.

## **8. PERSPECTIVAS**

A vigilância ativa no Hospital Geral de Mavalane nos próximos anos poderá fornecer respostas sobre o perfil etiológico das doenças diarréicas e a sazonalidade dos vírus estudados. Por essa razão, este estudo está em continuação, isto é, a coleta das amostras estará em curso até final de outubro totalizando 12 meses de coleta. Esta dissertação pode ser considerada como divulgação dos resultados parciais dos primeiros quatro meses (novembro de 2011 a fevereiro de 2012) de coleta das amostras.

Estudo de coinfeção será realizado no sentido de avaliar os efeitos da coinfeção no curso/gravidade da doença.

Estudos filogenéticos através do sequenciamento parcial genômico das amostras positivas para NoV e HAstV serão realizados.

A ampliação de vigilância das doenças diarréicas para outros hospitais, primeiramente, na cidade de Maputo e, posteriormente, a nível nacional, irá contribuir para a realização de um diagnóstico mais acurado da morbi-mortalidade associada às infecções por RV-A, NoV e HAstV.

## 9. BIBLIOGRAFIA

Abbott C, Tiede B, Armah G, Mahmoud A. Evaluation of cost-effectiveness of live oral pentavalent reassortant rotavirus vaccine introduction in Ghana. *Vaccine*. 2012;30(15):2582-7.

Aoki ST, Settembre EC, Trask SD, Greenberg HB, Harrison SC, Dormitzer PR. Structure of Rotavirus Outer-Layer Protein VP7 Bound with a Neutralizing Fab. *Science*. 2009;324:1444-6.

Arias CF, Isa P, Guerrero CA, Méndez E, Zárate S, López T, et al. Molecular Biology of Rotavirus Cell Entry. *ELSEVIER: Archives of Medical Research*. 2002;33:356-61.

Armah GE, Sow SO, Breiman RF, Dallas MJ, Tapia MD, Feikin DR, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2010;376(9741):606-14.

Arvay ML, Curns AT, Terp S, Armah G, Wontuo P, Parasher UD, et al. How Much Could Rotavirus Vaccines Reduce Diarrhea-Associated Mortality in Northern Ghana? A Model to assess Impact. *J Infect Dis*. 2009;200: S85-91.

Asensi MT, Martínez-Costa C, Buesa J. Anti-rotavirus antibodies in human milk: quantification and neutralizing activity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006;42(5):560-7.

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:15-37.

Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, et al. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(10):1553-7.

Basu G, Rossouw J, Sebunya TK, Gashe BA, de Beer M, Dewar JB, et al. Prevalence of rotavirus, adenovirus and astrovirus infection in young children with gastroenteritis in Gaborone, Botswana. *East Afr Med J*. 2003;80 (12): 652-5.

Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *J Med Virol*. 1997;51(2):101-6.

Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, Cattole G. Astrovirus infections in human and animals – Molecular biology, genetic diversity and interspecies transmissions. *Infection, Genetic and Evolution*. 2011;11:1529-44.

Bereciartu A, Bok K, Gómez J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. *Journal of Clinical Virology*. 2002;25:197-203.

Berry SA, Johns B, Shih C, Berry AA, Walker DG. The Cost-Effectiveness of Rotavirus Vaccination in Malawi. *J Infect Dis*. 2010;202 Suppl 1:S108-15.

Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Luthi TM. Norwalk-Like Virus Sequences in Mineral Waters: One-Year Monitoring of Three Brands. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68(4):1925-31.

Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N Engl J Med*. 1983;309(2):72-6.

Bjorkholm M, Celsing F, Runarsson G, Waldenstrom J. Successful intravenous immunoglobulin therapy for severe and persistent astrovirus gastroenteritis after fludarabine treatment in a patient with Waldenström's macroglobulinemia. *Int J Hematol*. 1995;62(2):117-20.

Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet*. 2008;371(9608):243-60.

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;375:1969-87.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Werthun-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology* 1990;28(3):495-503.

- Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K. Estimating Child mortality due to diarrhea in developing countries. *Bulletin of the World Health Organization*. 2008;86:710-17.
- Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Arrobio JO, Jeffries BC, Stallings EP, et al. Pediatric viral gastroenteritis during eight years of study. *J Clin Microbiol*. 1983;18(1):71-8.
- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 2005;365:1147-52.
- Caballero S, Guix S, El-Senousy WM, Calicó I, Pintó RM, Bosch A. Persistent gastroenteritis in children infected with astrovirus: association with serotype-3 strains. *J Med Virol*. 2003;71(2):245-50.
- Carlson JA, Middleton PJ, Szymanski MT, Huber J, Petric M. Fatal rotavirus gastroenteritis: an analysis of 21 cases. *Am J Dis Child*. 1978;132(5):477-9.
- Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Assis RMS, Fialho AM, Martins CMMA, Bóia MN, et al. Rotavirus Genotype Distribution after vaccine Introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2009;15(1):95-7.
- Carvalho-Costa FA, Assis RM, Fialho AM, Bóia MN, Alves DPD, Martins CMMA, et al. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(3):291-294.
- Carvalho-Costa FA, Volotão EM, Assis RMS, Fialho AM, Andrade JSR, Rocha LN, et al. Laboratory-based Rotavirus Surveillance During the Introduction of a vaccination Program, Brazil, 2005 – 2009. *Pediatric Infectious Disease J*. 2011;30(1):S35-41.
- Chadwick PR, McCann R. Transmission of a small round structured virus by vomiting during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J. Hosp. Infect*. 1994;26(4):251-9.
- Chandran A, Fitzwater S, Zhen A, Santosham M. Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines. *Biologics: Targets e Therapy*. 2010;4:213-20.
- Chang K. Role of Cholesterol Pathways in Norovirus Replication. *Journal of Virology*. 2009;83(17):8587-95.



Coulson BS, Grimwood K, Hudson IL, Barnes GL, Bishop RF. Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *J Clin Microbiol.* 1992;30(7):1678-84.

Cubbit WD, Mitchell DK, Carter MJ, Willcocks MM, Holzel H. Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. *J Med Virol.* 1999;57(3):313-21.

Cukor G, Nowak NA, Blacklow NR. Immunoglobulin M responses to the Norwalk virus of gastroenteritis. *Infect Immun.* 1982;37:463-468.

Cunliffe NA, Ngwira BM, Dove W, Thindwa BDM, Turner AM, Broadhead RL, et al. Epidemiology of Rotavirus Infection in children in Blantyre, Malawi, 1997-2007. *J Infect Dis.* 2010;202:S168-71.

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, et al. Characterization of rotavirus strain from newborns in New Delhi, India. *J. Clin. Microbiol.* 1994;32(7):1820-2.

Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Formal S, Buscho RF, Kasel JA, et al. Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Infect Dis.* 1971;123(3):307-12.

Dolin R, Reichman RC, Fauci AS. Lymphocyte populations in acute viral gastroenteritis. *Infect Immun.* 1976;14:422-8.

Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RC. Viral Shape – Shifting: Norovirus evasion of the human immune system. *Nature reviews/Microbiology.* 2010;8:231-41.

Eibi MM. The effect of routine rotavirus vaccination on healthcare utilization for diarrhea in US children. *Immunotherapy.* 2012;4(3):269-72.

Estes MK, Kapikian AZ, Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, (2007). *Fields Virology.* 5<sup>th</sup>. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wikins, 1918-1970pp.

Ferreira MSR, Victoria M, Carvalho-Costa FA, Vieira CB, Xavier MPTP, Fioretti JM, et al. Surveillance of Norovirus Infections in the State of Rio de Janeiro, Brazil 2005 – 2008. *J Med Virol.* 2010;82:1442-8.

Fischer TK, Steinsland H, Molbak K, Ca R, Gentsch JR, Valentiner-Branth P, et al. Genotypes profiles of rotavirus strains from children in suburban community in Guinea-Bissau, Western Africa. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38(1):264-267.

Franco MA, Greenberg HB. Challenges for rotavirus vaccines. *Virology* 2001;281(2):153-5.

Fukumi H, Nakaya R, Hatta S, Noriki H, Yunoki H, Akagi K, et al. An indication identity between the infectious diarrhea in Japan and the afebrile infectious nonbacterial gastroenteritis by human volunteer experiments. *Jpn J Med Sci Biol.* 1957;10:1-17.

Gabbay YB, Linhares AC, Cavalcante-Pepino EL, Nakamura LS, Oliveira DS, Silva LD, et al. Prevalence of Human Astrovirus Genotypes Associated With Acute Gastroenteritis Among Children in Belém, Brazil. *J Med Virol.* 2007;79:530-8.

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(6):1365-73.

Gibson KE, Crandall PG, Ricke SC. Virus Removal and Transfer on Food Contact Surfaces by Cleaning Cloths. *Appl Environ Microbiol.* 2012;70(9):3037-44.

Giordano MO, Martinez LC, Isa MB, Paez Rearte M, Nates SV. Childhood astrovirus-associated diarrhea in the ambulatory setting in a Public Hospital in Cordoba city, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004;46(2):93-6.

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

Glass RI, Parasher UD, Bresse JS, Turcios R, Fischer TK, Widdowson MA, Jiang B, Gentsch JR. Rotavirus vaccines current prospects ant future challengs. *Lancet.* 2006;368:323-32.

Gonzalez-Galan V, Sánchez-Fauquier A, Obando I, Montero V, Fernandez M, Torres MJ, Neth O, Aznar-Martin J. High prevalence of community-acquired norovirus gastroenteritis among hospitalized children: a prospective study. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:189-99.

Gordon I, Ingraham HS, Korn R. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J. Exp. Med.* 1947;170:34-43.

Gouvea V, Santos N, Timenetsky M, de C. Identification of bovine and porcine rotavirus G type by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994;32(5):1338-40.

Grech V, Calvagna V, Falzon A, Mifsud A. Fatal, rotavirus-associated myocarditis and pneumonitis in a 2-year-old boy. *Ann Trop Paediatr.* 2001;21(2):147-8.

Green KY, Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, (2007). *Fields Virology*. 5<sup>th</sup>. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 950-980pp.

Greenberg HB, Estes ME. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. *Gastroenterology* 2009;136:1939-51.

Guerrero ML, Noel JS, Mitchell DK, Calva JJ, Morrow AL, Martínez J, et al. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatr Infect Dis J.* 1998;17(8):723-7.

Guimarães FR, Ferreira FFM, Vieira CB, Fumian TM, Shubo T, Leite JPG, et al. Molecular detection of human astrovirus in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(8):819-23.

Guix S, Caballero S, Bosch A, Pintó RM. C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA. *J Virol.* 2004;78(24):13627-36.

Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolome R, Latorre C, Rabella N, et al. Molecular Epidemiology of Astrovirus Infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol.* 2002;40(1):133-9.

Gutiérrez-Escolano AL, Vázquez-Ochoa M, Escobar-Herrera J, Hernández-Acosta J. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311(3):759-66.

Herrmann JE, Nowak NA, Perron-Henry DM, Hudson RW, Cubitt WD, Blacklow NR. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *J Infect Dis.* 1990;161(2):226-9.

Hjelt K, Grauballe PC, Paerregaard A, Nielsen OH, Krasilnikoff PA. Protective effect of preexisting rotavirus-specific immunoglobulin A against naturally acquired rotavirus infection in children. *J Med Virol.* 1987;21(1):39-47.

Hung M, Valdivia JA, Silva, B. Folgosa E. Infecção por Rotavírus em crianças com e sem diarreia aguda em Maputo, Moçambique. *Revista Medica de Moçambique.* 1994;5(1):24-7.

INCAM (2009) *Mortalidade em Moçambique: Inquérito Nacional de causas de Mortalidade , 2007/8.* Editor: Instituto Nacional de Estatística. 100pp

Jeong HS, Jeong A, Cheon CS. Epidemiology of astrovirus infection in children. *Korean J Pediatric.* 2012;55(3):77-82.

Jiang X, Huang P, Zhong W, Tan M, Farkas T, Morrow AL, Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK. Human Milk Contains Elements That Block Binding of Noroviruses to Human Histo-Blood Group Antigens in Saliva. *The Journal of Infectious Diseases.* 2004;190:1850-9.

Jiang X, Wang J, Estes MK. Characterization of SRSVs using RT-PCR and a new antigen ELISA. *Arch Virol.* 1995;140:363-74.

Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis.* 1990;161(1):18-21.

Kabue JP, Peenze I, de Beer M, Esona MD, Lunfungula C, Biamungi M, et al.. Characterization of Human Rotavirus Recovered from children with Acute Diarrhea in

Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *The Journal of Infections Diseases*. 2010;202:193-7.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1548-57.

Kamel AH, Ali MA, El-Nady HG, de Rougemont A, Pothier P, Belliot GI. Predominance and Circulation of Enteric Viruses in the Region of Greater Cairo, Egypt. *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):1037-45.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol*. 1972;10:1075-81.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Levine MM, Yolken RH, VanKirk DH, Dolin R, et al. Oral administration of human rotavirus to volunteers: induction of illness and correlates of resistance. *J Infect Dis*. 1983;147(1):95-106.

Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, Singh N, Schonberger LB, Feldman R, et al. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med*. 1982;96:756-61.

Katrak S, Gasasira A, Arinaitwe E, Kakuru A, Wanzira H, Bigira V, et al. Safety and tolerability of artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperaquine for malaria in young HIV-infected and uninfected children. *Malaria Journal*. 2009;8:272.

Kittigul L, Pombubpa K, Taweekate Y, Yeephoo T, Khamrin P, Ushijima H. Molecular Characterization of Rotaviruses, Noroviruses, Sapovirus, and Adenoviruses in Patients With Acute Gastroenteritis in Thailand. *J Med Virol*. 2009;81:345-53.

Kobayashi S, Negishi Y, Ando N, Ito T, Nakano M, Togari H, et al. Two patients with acute rotavirus encephalitis associated with cerebellar signs and symptoms. *Eur J Pediatr*. 2010;169:1287-91.

Koci MD. Immunity and resistance to astrovirus infection. *Viral Immunol.* 2005;18(1):11-6.

Konno T, Suzuki H, Katsushima N, Imai A, Tazawa F, Kutsuzawa T, et al. Influence of temperature and relative humidity on human rotavirus infection in Japan. *Infect Dis.* 1983;147(1):125-8.

Kreutz LC, Seal BS, Mengeling WL. Early interaction of feline calicivirus with cells in culture. *Arch Virol.* 1994;136:19-34.

Kurtz JB, Lee TW, Craig JW, Reed SE. Astrovirus infection in volunteers. *J Med Virol.* 1979;3(3):221-30.

Lecce JG, Cummins JM, Richards AB. Treatment of rotavirus infection in neonate and weanling pigs using natural human interferon alpha. *Mol Biother.* 1990;2(4):211-16.

Levy K, Hubbard AE, Eisenberg JN. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 2009;38(6):1487-96.

Lew JF, Valdesuso J, Vesikari T, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK, et al. Detection of Norwalk virus or Norwalk-like virus infections in Finnish infants and young children. *J Infect Dis.* 1994;169(6):1364-7.

Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature Medicine.* 2003;9(5):548-53.

Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB, da Rosa ES, Mascarenhas JD, Loureiro EC. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. *Epidemiol Infect.* 1989;102(1):129-45.

Linhares AC, Ruiz-Palacios GM, Guerrero ML, Salinas B, Perez-Schael I, Clemens SA, et al. A short report on highlights of world-wide development of RIX4414: a Latin American experience. *Vaccine.* 2006;24(18):3784-5.

Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D, Witte D, Kirsten M, Louw C, et al. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *N Engl J Med.* 2010;362(4):289-98.

Madhi SA, Kirsten M, Louw C, Bos P, Aspinall S, Bouckennooghe A, et al. Efficacy and immunogenicity of two or three dose rotavirus-vaccine regimen in South African children over two consecutive rotavirus-seasons: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Vaccine*. 2012;(Suppl 30):A44-A51.

Makita K, Hayakawa Y, Okame M, Homma K, Phan TG, Okitsu S, et al. First detection of IgA against norovirus in breast milk. *Clin. Lab*. 2007;53:125-8.

Mandomando IM, Macete EV, Ruiz J, Sanz S, Abacassamo F, Vallêz X, et al. Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural Hospital of Southern Mozambique. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2007;76(3):522-7.

Mans J, Villiers JC, du Plessis NM, Avenant T, Taylor MB. Emerging norovirus GII.4 2008 variant detected in hospitalised paediatric patients in South Africa. *Journal of Clinical Virology*. 2010;49:258-64.

Matson DO, O'Ryan ML, Herrera I, Pickering LK, Estes MK, 1993. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *J Infect Dis* 167 (3): 577-83.

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 2011;56:1397-413.

Mattison K, Sebunya TK, Shukla A, Noliwe LN, Bidawid S. Molecular Detection and characterization of Norovirus From Children in Botswana. *J Med Virol*. 2010;82:321-324.

Méndez E, Arias CF, Astroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, (2007). *Fields Virology*. 5<sup>th</sup>. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wikins, 982-1000pp.

Méndez-Toss M, Griffin DD, Calva J, Contreras JF, Puerto FI, Mota F, et al. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *J Clin Microbiol*. 2004;42(1):151-7.

MICS (2008) *Inquérito de Indicadores Múltiplos*. Editor: Instituto Nacional de Estadística. 71pp.

Midthun K, Greenberg HB, Kurtz JB, Gary GW, Lin FY, Kapikian AZ. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *J Clin Microbiol.* 1993;31(4):955-62.

Mitchell DK, Monroe SS, Jiang X, Matson DO, Glass RI, Pickering LK. Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 1995;172(6):1437-44.

Molberg O, Nilsen EM, Sollid LM, Scott H, Brandtzaeg P, Thorsby E, et al. CD4+ T cells with specific reactivity against astrovirus isolated from normal human small intestine. *Gastroenterology.* 1998;114(1):115-22.

Monroe SS. Control and Prevention of Viral Gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases.* 2011;17(8):1347-48.

Moser LA, Schultz-Cherry S. Pathogenesis of astrovirus infection. *Viral Immunol.* 2005;18(1):4-10.

Moyo SJ, Gro N, Kirsti V, Matee MI, Kitundu J, Maselle SY, et al. Prevalence of enteropathogenic viruses and molecular characterization of group A rotavirus among children with diarrhea in Dar es Salaam Tanzania. *BMC Public Health.* 2007;7:359.

Mukherjee A, Chattopadhyay S, Bagchi P, Dutta D, Singh NB, Arora R, et al. Surveillance and molecular characterization of rotavirus strains circulating in Manipur north-eastern India: increasing prevalence of emerging G12 strains. *Infect. Genet. Evol.* 2010;10(2):311-29.

Naficy AB, Abu-Elyazeed R, Holmes JL, Rao MR, Savarino SJ, Kim Y, et al. Epidemiology of rotavirus diarrhea in Egyptian children and implications for disease control. *Am J Epidemiol.* 1999;150(7):770-7.

Naficy AB, Rao MR, Holmes JL, Abu-Elyazeed R, Savarino SJ, Wierzbica TF, et al. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. *J Infect Dis.* 2000;182(3):685-90.

Neill JD. The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Res.* 2002;87(1):89-93.



Neill JD, Mengeling WL. Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res.* 1998;11:59-72.

Nhampossa T, Mandomando I, Acacio S, Quintó L, Vubil D, Ruiz J, et al. (2015). Diarrheal Disease in Rural Mozambique: Burden, Risk Factors and Etiology of Diarrheal Disease among Children Aged 0 – 59 Months Seeking Care of Health Facilities. *Plos ONE* 10(5): e0119824. doi: 10.1371/journal.pone0119824

Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, Monroe SS, Glass RI. Identification of a Distinct Common Strain of “Norwalk-like Viruses” Having a Global Distribution. *J Infect Dis.* 1999;179:1334-44.

Nowak P, Topping JR, Fotheringham V, Gallimore CI, Gray JJ, Iturriza-Gómara M, et al. Measurement of the virolysis of human GII.4 norovirus in response to disinfectants and sanitisers. *J Virol Methods.* 2011;174(1-2):7-11.

Nyangao J, Page N, Esona M, Peenze I, Gatheru Z, Tukei P, et al. Characterization of Human Rotavirus Strains from children with Diarrhea in Nairobi and Kisumu, Kenya, between 2000 and 2002. *The Journal of Infections Diseases.* 2010;202:187-92.

O’Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. *J Infect Dis.* 1994;169(3):504-11.

Pager C, Steele D, Gwamanda P, Driessen M. A neonatal death associated with rotavirus infection-detection of rotavirus dsRNA in the cerebrospinal fluid. *S Afr Med J.* 2000;90(4):364-5.

Palombo EA, Bishop RF. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J Clin Microbiol.* 1996;34(7):1750-53.

Pang XL, Preiksaitis JK, Lee B. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol.* 2005;33(2):168-71.

Pang XL, Joensuu J, Vesikari T. Human calicivirus-associated sporadic gastroenteritis in Finnish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1999;18:420-6.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JC, Glass RI. Rotavirus and Severe childhood Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases.* 2006;12(2):304-6.

Parra GI, Bok K, Taylor R, Haynes J, Sosnovtsev SU, Richardson C, et al. Immunogenicity and specificity of norovirus consensus GII.4 virus-like particles in monovalent and bivalent vaccine formulations. *Vaccine.* 2012;1-7.

Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med.* 1977;297(2):86-9.

Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: A comprehensive review. *Journal of Clinical Virology.* 2009;44:1-8.

Plenge-Boning A, Soto-Ramirez N, Karmaus W, Petersen G, Davis S, Forster J. Breastfeeding protects against acute gastroenteritis due to rotavirus in infants. *Eur J Pediatr.* 2010 cited in Pubmed, DOI10.1007/s00431-010-1245-0.

Potgieter N, Beer MC, Taylor MB, Steele AD. Prevalence and Diversity of Rotavirus Strains in Children with Acute Diarrhea from Rural Communities in the Limpopo Province, South Africa, from 1998 to 2000. *J Infect Dis.* 2010;202 Suppl 1:S148-55.

Ramig RF, 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus Infection. *J Virol.* 2004;78:10213-20.

Resque HR, Munford V, Castilho JG, Schmich H, Caruzo TAR, Rácz ML. Molecular characterization of astrovirus in stool sample from children in São Paulo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2007;102(8):969-74.

Richardson S, Grimwood K, Gurrell R, Palombo E, Barnes G, Bishop R. Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. *Lancet.* 1998;351:1844-48.

Rodriguez WJ, Kim HW, Arrobio JO, Brandt CD, Chanock RM, Kapikian AZ, et al. Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infants and young children. *J Pediatr*. 1997;91(2):188-93.

Rodriguez-Baez N, O'Brien R, Qui SQ, Bass DM. Astrovirus, Adenovirus, and Rotavirus in hospitalized children: Prevalence and association with gastroenteritis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2002;35(1):64-68.

Royuela E, Negredo A, Sánchez-Fauquier A. Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus. *J Virol Methods*. 2006;133(1):14-9.

Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, et al. Human Rotavirus Vaccine Study Group, Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med*. 2006;354(1):11-22.

Samajdar S, Varghese V, Barman P, Ghosh S, Mitra U, Dutta P, et al. Changing pattern of human group A rotaviruses: emergence of G12 as an important pathogen among children in eastern India. *Journal of Clinical Virology*. 2006;36(3):183-8

Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol*. 2005;15:29-56.

Schnagl RD, Belfrage K, Farrington R, Hutchinson K, Lewis V, Erlich J, et al. Incidence of human astrovirus in central Australia (1995 to 1998) and comparison of deduced serotypes detected from 1981 to 1998. *J Clin Microbiol*. 2002;40(11):4114-20.

Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS. The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med*. 1973;288:1318-23.

Schwens A, Vanden Broecke C, Maenhoudt M, Béduin JM, Wérenne J, Pastoret PP. Experimental rotavirus diarrhoea in colostrum-deprived newborn calves: assay of treatment by administration of bacterially produced human interferon (Hu-IFN alpha 2). *Ann Rech Vet*. 1985;16(3):213-8.

Sdiri-Loulizi K, Gharbi-Khelifi H, Rougemont A, Hassine M, Chouchane S, Sakly N, et al. Molecular Epidemiology of Human Astrovirus and Adenovirus Serotypes 40/41 Strains Related to Acute Diarrhea in Tunian Children. *J Med Virol.* 2009;81:1895-902.

Sebire NJ, Malone M, Shah N, Anderson G, Gaspar HB, Cubitt WD. Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient. *J Clin Pathol.* 2004;57(9):1001-3.

Seheri LM, Page N, Dewar JB, Geyer A, Nemarude AL, Bos P, et al. Characterization and molecular Epidemiology of Rotavirus Strain Recovered in Northern Pretoria, South Africa during 2003 - 2006. *J Infect Dis.* 2010;20:139-47.

Silva PA, Skark K, Mockenhaupt FP, Reither K, Weitzel T, Ignautius R, et al. Molecular Characterization of Enteric Viral Agents from Children in Northern Region of Ghana. *J Med Virol.* 2008;80:1790-8.

Smit TK, Bos P, Peenze I, Jiang X, Estes MK, Steele AD. Seroepidemiological Study of Genogroup I and II Calicivirus Infections in South and Southern Africa. *J Med Virol.* 1999;59:227-31.

Soares-Weiser K, Maclehose H, Bergman H, Ben-Aharon I, Nagpal S, Goldberg E, et al. Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;15:2:CD008521.

Sukhrie FHA, Teunis P, Vennema H, Copra C, Thijs Beersma MFC, Bogerman J, et al. Nosocomial Transmission of Norovirus Is Mainly Caused by Symptomatic Cases. *Clinical Infectious Diseases.* 2012;54(7):931-7.

Tan M, Hegde RS, Jiang X. The P Domain of Norovirus Capsid Protein Forms Dimer and Binds to Histo-Blood Group Antigen Receptors. *J. Virol.* 2004;78(12):6233-42.

Taniguchi K, Urasawa T, Kobayashi N, Gorziglia M, Urasawa S. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: implication for new serotype specificity. *J Virol.* 1990;64:5640-4.

Taylor MB, Cox N, Very MA, Grabow WO. The occurrence of hepatitis A and astroviruses in selected river and dam waters in South Africa. *Water Research*. 2001;35(11):2653-60.

Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, et al. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol*. 2008;80(8):1468-76.

UNICEF (2006) *A Pobreza na infância em Moçambique: Uma análise de situações e tendências*. Nações Unidas, Moçambique, 255pp.

Vesikari T, Isolauri E, D'Hondt E, Delem A, André FE, Zissis G. Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet*. 1984;1(8384):977-81

Vesikari T, Karvonen AV, Majuri J, Zeng SQ, Pang XL, Kohberger R, et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of 2 doses of bovine-human (UK) and rhesus-rhesus-human rotavirus reassortant tetravalent vaccines in Finnish children. *J Infect Dis*. 2006;194(3):370-6.

Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich M. Prevalence and Molecular Epidemiology of Noroviruses in Hospitalized Children With Acute Gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2007;27(7):602-6.

Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JPG, Miagostovich MP. Genotypes and Molecular Epidemiology of Human Astroviruses in Hospitalized Children With Acute Gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brasil. *J Med Virol*. 2007;79:939-44.

Vinje 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.

Waggie Z, Hawkrigde A, Hussey GD. Review of Rotavirus Studies in Africa: 1976–2006. *J Infect Dis*. 2010;202 Suppl 1: S23-33.

Wang Y, Dennehy PH, Keyserling HL, Tang K, Gentsch JR, Glass RI, et al. Rotavirus infection alters peripheral T-cell homeostasis in children with acute diarrhea. *J Virol* 2007;81(8):3904-12.

WHO, 2005. Diarrhoea Treatment Guidelines including new recommendation for the use of ORS and zinc supplementation For Clinic – Based Healthcare Works, 58pp.

WHO, 2009. *Manual of rotavirus detection and characterization methods*. 156pp.

WHO. Weekly epidemiological record. Meeting of the strategic Advisory Group of Experts on Immunization, November 2011 – conclusions and recommendations. 2012;1(87):1-16.

Wilcox CM, Waites KB, Smith PD. No relationship between gastric pH, small bowel bacterial colonisation, and diarrhoea in HIV-1 infected patients. *Gut*. 1999;44:101-5.

Wilhermi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9:247-62.

Willcocks MM, Boxall AS, Carter MJ. Processing and intracellular location of human astrovirus non-structural proteins. *J Gen Virol*. 1999;80(Pt 10):2607-11.

Wobudeya E, Bachou H, Karamagi CH, Kalyango JN, Mutebi E, Wamani H. Breastfeeding and the risk of rotavirus diarrhea in hospitalized infants in Uganda: a matched case control study. *BMC Pediatrics* 2011;11:17.

Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, DuPont HL, Buscho RF, Thornhill TS, et al. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis*. 1974;129(6):709-14.

## ANEXOS

### Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### **Detecção de Gastroenterites Virais e Caracterização Molecular dos Rotavírus, em Crianças com Menos de 5 anos de Idade com Gastroenterite Aguda no Hospital Geral de Mavalane na Cidade de Maputo, Moçambique**

Exmo(a) Senhor(a)

Eu, Jorfélia José Chilaúle do Instituto Nacional de Saúde, gostaria de convidar a sua criança a participar como voluntária numa pesquisa.

Antes de tomar a decisão leia com atenção a folha de informação de consentimento, que lhe dará a informação necessária sobre os vários aspectos do estudo.

1. Título do estudo: Detecção das gastroenterites virais e caracterização molecular dos rotavírus em crianças menores de 5 anos de idade com gastroenterite aguda no Hospital Geral de Mavalane na cidade de Maputo. Este estudo é um esforço conjunto do Instituto Nacional de Saúde e Fundação Oswaldo Cruz – Brasil, pelo Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (é um laboratório de referência regional para gastroenterites de etiologia viral no Brasil).
2. Objetivo de estudo: Estimar a frequência das gastroenterites por rotavírus, norovírus e astrovírus; genotipar os rotavírus em amostras de fezes de crianças com menos de 5 anos de idade no Hospital Geral de Mavalane.
3. Porquê participar neste estudo:
  - a. Informação de base:

A gastroenterite (diarréia) aguda é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo inteiro sendo que as crianças são mais susceptíveis. As complicações ocorrem devido á desidratação e ao desequilíbrio hidroelectrolítico que ocorrem quase sempre devido ao tratamento inadequado e falta de assistência médica.

A diarréia é causada por vários microrganismos dentre eles parasitas, bactérias e vírus. Os vírus responsáveis pela diarréia são: rotavírus, norovírus e astrovírus. A transmissão ocorre por via fecal-oral.
  - b. Com a participação da sua criança no estudo, será possível estimar a frequência da diarréia causada por vírus e conhecer os diferentes genótipos dos rotavírus em circulação. Assim nós, investigadores, esperamos com este estudo poder elaborar recomendações ao Ministério da Saúde de Moçambique e adoptar medidas eficazes para controle e prevenção das diarréias causadas por vírus.
4. Seleccção dos participantes:
  - a. A sua criança foi seleccionada como candidata para participar no estudo porque possui os critérios de inclusão para o estudo que são:
    - i. Ter menos de 5 anos de idade e está sendo atendida no Hospital Geral de Mavalane.

- ii. Ser atendida durante o período de Novembro de 2011 a Fevereiro de 2012.
- iii. Ter um quadro clínico de gastroenterite (diarréia) aguda, definida como: aumento de número de evacuações (no mínimo 3 vezes por dia) com fezes moles (aquosas ou de pouca consistência).

5. Procedimentos do estudo:

- a. Se o senhor(a) permitir a participação da sua criança, um investigador preencherá um questionário onde serão feitas algumas perguntas clínicas e não clínicas, por exemplo: quantos anos tem a criança, onde mora, a quanto tempo esta com diarréia.
- b. Ainda durante a realização do estudo, será colhida uma amostra de fezes num frasco. Esta amostra de fezes será usada na realização de testes laboratoriais para detecção de rotavírus, norovírus e astrovírus.

6. Vantagens em participar no estudo:

- a. A participação da sua criança no estudo, fornecerá dados concretos e actualizados da circulação dos vírus que causam diarréia.
- b. O estudo vai contribuir com novos conhecimentos médicos, informação clínica e laboratorial adicional o que poderá ajudar na melhoria dos cuidados a prestar às crianças com diarréias causadas por vírus.
- c. Não haverá benefício directo á sua criança em participar deste estudo, contudo, após os exames laboratoriais o senhor(a) terá o resultado dos testes da sua criança.

7. Riscos associados á participação da sua criança

- a. Durante o processo da colheita da amostra de fezes, a sua criança não sentirá dor. A participação no estudo não terá risco adicional á saúde da sua criança.

8. Os direitos da sua criança durante o estudo e confiabilidade

O registo relativo á participação da sua criança será usado apenas para os efeitos do estudo. Qualquer informação que possa identificá-la será mantida confidencial e somente poderá ser divulgada com a sua permissão.

A sua decisão em participar ou não no estudo não irá prejudicar a relação futura do senhor(a) e da sua criança com o Hospital Geral de Mavalane e se o senhor(a) consentir em participar neste estudo, é livre em retirar o consentimento e interromper a participação a qualquer momento sem qualquer prejuízo.

Se o senhor(a) nos permitir com a sua assinatura neste documento, nós planeamos divulgar os resultados deste estudo em conferências nacionais e internacionais assim como publicar os mesmos numa revista internacional.

O senhor(a) poderá ter acesso á sua informação a qualquer altura e o seu direito a rectificá-la ou opôr-se a ela é garantido durante o estudo. Este direito pode ser exercido mediante o intermediário do coordenador local da pesquisa, cujo nome é mencionado abaixo.

9. Quem pode contactar em caso de dúvida ou problemas:

- a. Se o senhor(a) tiver alguma questão ou problemas sobre o estudo pode contactar:

**Jorfélia Chilaúle** coordenador do estudo pelo telefone: 258 82 43 43 470

Email: *jorfeliachilaule01@yahoo.com.br*

*Jorfeliachilaule@gmail.com*



### **Declaração do participante**

Fui informado verbalmente e por escrito sobre este estudo e compreendo de que se trata. Sei também a quem contactar se necessitar de mais informação. Compreendo que a confidencialidade será mantida. Compreendo que sou livre de me retirar do estudo em qualquer altura sem que isto afecte os cuidados normalmente recebidos na clínica. Concordo participar neste estudo como sujeito voluntário e serei dado uma cópia desta folha de informação para guardar.

-----  
Data e hora:

-----  
Nome do paciente

-----  
Data e hora:

-----  
Nome do acompanhante

-----  
Assinatura (ou impressão do polegar) do acompanhante

### **Declaração do pesquisador**

Eu, abaixo-assinado, defini e expliquei ao voluntário numa linguagem que ele compreende, os procedimentos do estudo, os seus objetivos e o risco e benefícios associados com a sua participação. Informei o voluntário que a confidencialidade será mantida e que este é livre de se retirar do estudo em qualquer altura sem que isto afecte os cuidados que recebe na clínica. Seguindo as minhas definições e explicações o voluntário concorda participar no estudo.

-----  
Data e hora

-----  
Nome do pesquisador

-----  
Assinatura

## Anexo 2: Formulário de Registo do Participante

### Detecção de Gastrenterites Virais e Caracterização Molecular dos Rotavírus, em Crianças com Menos de 5 anos de Idade com Gastroenterite Aguda no Hospital Geral de Mavalane na Cidade de Maputo, Moçambique.

#### DADOS PESSOAIS

- Data de colheita \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
1. Nome: \_\_\_\_\_ NID \_\_\_\_/\_\_\_\_ N° de Registro \_\_\_\_\_
2. Idade: \_\_\_\_ dias \_\_\_\_ meses
3. Sexo:  Feminino  Masculino
4. Residente: Cidade: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_
5. Frequenta escolinha (Creche):  Sim  Não
6. Tipo de Alimentação
- Somente leite materno
- Leite materno e outros
- Outros
7. Quando foi o desmame
- 0 – 6 meses
- 7 – 12 meses
- mais de 12 meses
- não lembro

#### INFORMAÇÃO CLÍNICA DO PACIENTE

8. Data do início da diarreia \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
9. Sintomas
- dores abdominais  dores de cabeça
- febre  tosse e outros sintomas respiratórios (corriza)
- náuseas  vômitos
- outros, quais? \_\_\_\_\_
10. Condição (doença) associada \_\_\_\_\_
- 
11. Necessidade de hidratação venosa:  sim  não
12. Uso de antibióticos:  sim  não
- Se sim, qual: \_\_\_\_\_
13. Duração da diarreia:  0 – 7 dias  8 – 15 dias  mais de 15 dias
- 
14. Viajou nos últimos 7 dias:  sim  não
- Se sim, para onde: \_\_\_\_\_
15. Comeu fora (no restaurante, barraca) nos últimos 7 dias:  sim  não
16. Tempo de internação \_\_\_\_ dias
- Data de internação \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Data de alta \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Anexo 3: Aprovação ética



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE  
IRB00002657

Exma Senhora  
Dr.<sup>a</sup> Jorfelia José Chilaule  
INS

Ref: 281/CNBS/11

Data 29 de Setembro de 2011

**Assunto:** *aprovação do protocolo "Detecção de Gastroenterites Virais e Caracterização Molecular dos Rotavirus em Crianças Menores de 5 anos de Idade com Gastroenterite Aguda no Hospital de Mavalane na Cidade de Maputo, Moçambique."*

O Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou as correcções efectuadas no protocolo intitulado: "**Detecção de Gastroenterites Virais e Caracterização Molecular dos Rotavirus em Crianças Menores de 5 anos de Idade com Gastroenterite Aguda no Hospital de Mavalane na Cidade de Maputo, Moçambique.**" Sobre o mesmo chegou à seguinte conclusão:

O CNBS não vê nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a realização do estudo pelo que, dá a sua devida aprovação.

Contudo, recomenda os investigadores que o mantenham informado do decurso do estudo.

Faz notar que a aprovação ética não substitui a autorização administrativa.

Sem mais de momento as nossas cordiais saudações.

O Vice



Dr. João Schwalbach

ENDEREÇO:  
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
C. POSTAL 264  
Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allende  
MAPUTO – MOÇAMBIQUE

Telefones: 430814/427131(4)  
Telex: 6-239 MISAU MO  
FAX: 258 (1) 426547  
258 (1) 33320