

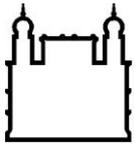
MINISTÉRIO DA SAÚDE FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ INSTITUTO OSWALDO
CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde

**DETECÇÃO DE ENTEROVÍRUS NÃO-PÓLIO EM CRIANÇAS COM
DIARREIA AGUDA NA CIDADE DE MAPUTO**

VIRGÍNIA NHABOMBA CHAMBE

Maputo, Julho de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em ciências de saúde

Virgínia Nhabomba Chambe

**Detecção de Enterovírus Não-Pólio Em Crianças com Diarreia Aguda na Cidade
de Maputo**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo
Cruz como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências De Saúde

Orientador (es): Prof. Dr. Edson Elias da Silva
Prof. Dra Nilsa de Deus

MAPUTO, Julho de 2017

Chambe, Virginia Nhabomba .

DETECÇÃO DE ENTEROVÍRUS NÃO-PÓLIO EM CRIANÇAS COM
DIARREIA AGUDA NA CIDADE DE MAPUTO / Virginia Nhabomba Chambe. -
Maputo, 2017.

XV, 72 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, 2017.

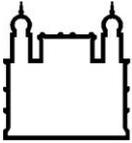
Orientador: Edson Elias Da Silva.

Co-orientadora: Nilsa De Deus.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Enterovirus. 2. Diarreia. 3. RT-PCR. I. Título.

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



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Ciências De Saúde

AUTOR: Virgínia Nhabomba Chambe

**Detecção de Enterovírus Não-Pólio em Crianças com Diarreia Aguda na Cidade
de Maputo**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Edson Elias da Silva Prof.
Dra Nilsa de Deus**

Aprovada em: 14/07/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Alda Maria da Cruz - Presidente
Prof. Dr. Cláudia Baúle - Vogal
Prof. Dr. Nídia Canji Vaz - Vogal
Prof. Dr. Manoel Barral Neto - Suplente

Maputo, aos 14 de Julho de 2017

Dedicatória

Ao meu pai, Marcelino G. Nhabomba (em memória), por me incentivar sempre com os seus ensinamentos e exemplo de vida que nunca é tarde para lutar pelos meus ideais até alcançar os objectivos. Que podemos chegar ao cimo da montanha por mais alta que seja, tudo o que precisamos é ter fé e perseverança.

Agradecimentos

À Deus Pai, por me proteger, guiar e me manter firme nesta caminhada.

Aos meus orientadores, Dra Nilsa de Deus, Dr Edson Elias da Silva, Dr Diocreciano Matias Bero, por todo apoio e paciência em me ensinar o caminho da ciência e investigação.

Ao INS e à coordenação do Mestrado em Ciências de Saúde pela oportunidade de ingressar no curso. Aos docentes pelas aulas e esclarecimentos e ajuda durante este período. Aos meus colegas de turma pela ajuda sempre que precisei.

À Dra Luisa Celma Meque, por acreditar em mim, me dar esta oportunidade e fazer de tudo para que eu pudesse estudar.

À minha família, meus filhos (Igor, Júnior, Dany e Sharmila), pelo apoio incondicional e por me incentivarem a seguir sempre em frente e nunca desistir mesmo nos momentos mais difíceis. À minha mãe, meus irmãos pelo carinho e apoio durante toda esta caminhada.

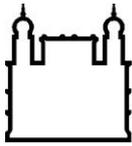
A todo o Team ViNaDia, pelo acolhimento, por aceitarem que faça parte deste grande Team, pela ajuda, pelas suas contribuições para que este trabalho fosse realizado com sucesso.

A todo pessoal das enfermarias de pediatria dos hospitais gerais de Mavalane e José Macamo pelo acolhimento e por tornar possível a colheita de amostras, muito em especial a enfermeira Aunésia Marurele, ponto focal do HGM, a enfermeira Mércia, enfermeira Olga pela ajuda durante o período de colheita de amostras. Um obrigado especial aos pacientes por aceitarem participar do estudo e por me fornecerem as amostras.

A todo o pessoal do Departamento de Imunologia, Laboratório de Isolamento Viral e Laboratório de Virologia Molecular, pelo acolhimento, ajuda e por me proporcionarem bom ambiente de trabalho durante todo o período que lá permaneci.

Ao pessoal do Laboratório de Enterovirus da FioCruz/Brasil, pelo acolhimento, ajuda, esclarecimentos e ensinamentos durante a minha estadia no Brasil.

A todos aqueles que me esqueci de mencionar mas que directa ou indirectamente contribuíram para que este meu sonho se realizasse, o meu muito obrigado!



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Detecção De Enterovírus Não-Pólio Em Crianças Com Diarreia Aguda Na Cidade De Maputo

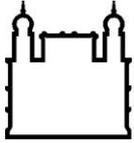
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Virgínia Nhabomba Chambe

Os Enterovírus humanos (HEV) pertencem à família *Picornaviridae*. A identificação molecular dos sorotipos baseada no sequenciamento do gene *VP1* levou a que fossem classificados em quatro espécies (A a D). A maior parte das infecções por Enterovírus (EVs) são consideradas assintomáticas mas cerca de 1% delas pode causar doença grave, principalmente em crianças e imunocomprometidos. A principal via de transmissão é a fecal-oral. A diarreia é considerada a 3ª causa de mortalidade em menores de 5 anos em Moçambique. No entanto, 30 a 40% de casos são de etiologia desconhecida. Este estudo teve como objectivo identificar Enterovírus não-pólio em amostras de fezes de crianças menores de 15 anos com diarreia aguda na cidade de Maputo. Foi realizado um estudo transversal no qual foram colhidas um total de 227 amostras fecais nos Hospitais Gerais de Mavalane e José Macamo, no período de Maio de 2014 a Dezembro de 2015. Estas amostras foram processadas usando a técnica de RT-PCR, onde se obteve o resultado de 14% de positividade à pesquisa de Enterovírus Não-Pólio (EVNP) (32 amostras positivas). As amostras positivas foram enviadas ao laboratório de referência de enterovírus para testes de confirmação. Testadas pelo método Real Time PCR obteve-se o resultado de 29 positivas e 3 indeterminadas. Já pelo isolamento viral, foi possível apurar a identidade viral de 19 amostras tendo sido isolados os seguintes sorotipos: E3, E13, E31, CV-A13, CV-A20, CV-A24 e o EV-C99. A maior taxa de detecção dos EVNP foi registada em crianças dos 0 aos 24 meses e nas crianças que possuíam uma alimentação diversificada. Estes resultados sugerem a participação destes patógenos em quadros de GEA. No entanto, para verificar a associação destes com a doença seria necessário realizar um estudo caso-controle.

PALAVRAS CHAVE: Enterovírus; Diarreia; RT-PCR



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Detection of non-polio enteroviruses in children with acute diarrhea in Maputo city

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Virgínia Nhabomba Chambe

Human enterovirus (HEV) belongs to the **Picornaviridae** family. The molecular identification of serotypes based on the sequencing of the VP1 gene led to their being classified in species A to D. The majority of enterovirus infections are asymptomatic, however 1% can cause severe and even fatal disease in children and immunocompromised individuals. The main route of transmission is fecal-oral. Almost all children suffer from various episodes of diarrhea during their first years of life. Diarrhea is considered the 3rd cause of mortality in children under 5 years of age in Mozambique. However, 30 to 40 % of the cases are of unknown etiology. This study aimed to identify non-polio enterovirus in fecal samples of children under 15 years of age with acute diarrhea in Maputo city. A cross-sectional study was carried out in which a total of 227 faecal samples were collected at the General Hospitals of Mavalane and José Macamo from May 2014 to December 2015. These samples were processed using the RT-PCR technique, resulting in 32 positive samples (14% of positivity to NPEV). Positive samples were sent to the FioCruz / Brazil enterovirus reference laboratory where tests were performed to confirm viral identity. Tested by the Real Time PCR method, the result was 29 positive and 3 undetermined. It was possible to determine the viral identity of 19 samples and the following serotypes were isolated: E3, E13, E31, CV-A13, CV-A20, CV-A24 and EV-C99. The highest detection rate of non-polio enterovirus was recorded in children from 0 to 24 months and in children who had a diversified diet. This results suggest the participation of these pathogens in GEA. However, to verify the association of those with the disease would be necessary to perform a case-control study.

Keywords: Enterovirus; Diarrhea; RT-PCR

Índice

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos Gerais.....	1
1.1.1. Historial dos <i>Enterovirus</i>	2
1.1.2. Propriedades físicas e químicas dos <i>Enterovirus</i>	4
1.1.3. Estrutura dos <i>enterovirus</i>	5
1.1.4. Características Antigénicas	7
1.1.5. Propagação em culturas celulares	8
1.1.6. Infecção em animais de experimentação.....	9
1.1.7. Classificação dos EV humanos	10
1.1.8. Transmissão dos Enterovirus.....	11
1.1.9. Tropismo celular e tecidual.....	13
1.1.10. Resposta Imune	13
1.1.11. Imunopatologia dos enterovirus	14
1.1.12. Epidemiologia	15
1.1.13. Prevalência e incidência da doença.....	16
1.1.14. Manifestações clínicas	16
1.1.15. Doenças associadas aos Enterovirus.....	17
1.1.16. Diagnóstico	18
1.1.17. Diagnóstico laboratorial.....	19
1.1.18. Prevenção e controle de EV.....	22
1.1.19. Distribuição geográfica dos EV	22
1.2. Justificativa	23
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Área de estudo	25
3.2. Aspectos Éticos	26
3.2.1. Consentimento informado	26

3.3. Desenho do estudo.....	27
3.4. Critérios de inclusão.....	27
3.5. Critérios de exclusão.....	27
3.6. Tamanho da amostra	27
3.7. Análise Estatística	28
3.8. Amostras clínicas	28
3.9. Colheita, Transporte e conservação das amostras	29
3.10. Processamento das amostras	31
3.10.1. Etapa1: Preparação de suspensões fecais	31
3.10.2. Etapa 2: Extracção de RNA.....	31
3.10.3. Etapa 3: Transcriptase Reversa- Reacção em cadeia da Polimerase (RT-PCR)	31
3.10.4. Visualização dos produtos amplificados em gel de agarose	32
3.10.5. Envio de amostras.....	32
3.10.6. Preparação das suspensões fecais	33
3.10.7. Extracção de RNA.....	33
3.10.8. PCR em Tempo Real.....	33
3.11. Isolamento Viral	35
3.11.1. Inoculação em culturas celulares.....	35
3.11.2. Detecção de enterovírus a partir dos isolados em linhagens de cultura celular.....	36
3.12. Identificação molecular dos enterovírus isolados.....	38
3.12.1. Extracção de RNA.....	38
3.12.2. Síntese do DNA complementar (c-DNA)	38
3.12.3. Reacção em Cadeia da Polimerase para enterovírus não-pólio	39
3.12.4. Avaliação do produto da PCR em gel de agarose	39
3.13. Purificação dos produtos da PCR	39
3.13.1. Reacção de sequenciamento- cycle sequencing.....	40
3.13.2. Precipitação do DNA por isopropanol	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Características sócio-demográficas dos participantes	41
4.2. Características sóciodemográficas das crianças com diarreia aguda e positivas a enterovírus não pólio.....	41
4.3. Características clinicas das crianças positivas ao enterovirus não pólio	44

4.4. Detecção de Enterovírus por Real time PCR	45
4.5. Isolamento viral através do cultivo celular	46
4.6. Sorotipos de Enterovírus Não-Pólio isolados	47
5. DISCUSSÃO	49
6. PERSPECTIVAS/RECOMENDAÇÕES	52
6.1. Perspectivas	52
7. CONCLUSÕES	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
9. APÊNDICES E/OU ANEXOS	61

Índice de Figuras

Figura 1 Esquema do genoma de enterovírus, mostrando suas diferentes regiões e locais de clivagem	6
Figura 2 Estrutura do capsídeo de enterovírus	7
Figura 3 Fluxograma de recolha e testagem das amostras	30
Figura 4 Visualização das bandas em gel de agarose 1%. O fragmento amplificado foi de 153pb Onde:	43
Figura 5 Frequência de detecção de EVNP por faixa etária	43
Figura 6 Visualização das bandas no gel de acrilamida	46
Figura 7 Sorotipos dos enterovirus não-polio identificados	48

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação actual dos EV humanos	11
Tabela 2: Doenças associadas as infecções por Enterovírus	17
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR em tempo real One-Step para pesquisa do genoma do grupo de enterovírus	34
Tabela 4: Preparação da mistura para a reação de PCR em tempo real One-Step para a busca do genoma dos enterovírus	34
Tabela 5: Ciclos descritos pelo fabricante para a realização da técnica de PCR em tempo real One-Step.	34
Tabela 6: Características sócio-demográficas e comparação entre os negativos e positivos à pesquisa de EVNP por RT-PCR dos participantes do estudo.	42

Tabela 7: Principais sintomas clínicos reportados pela população de estudo.	45
Tabela 8: Espécies, sorotipos de enterovirus não-pólio isolados e sintomologia clínica reportada em crianças com diarreia aguda	47

Lista de Siglas e Abreviaturas

CNBS - Conselho Nacional de Bioética em Saúde
DNA - Ácido desoxirribonucleico dNTPs -
Dinucleotídeos Tris-Fosfato
DTT - Di-thio-treitol
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EV - Enterovírus
EVF - Enterovírus Forward
EVR - Enterovírus Reverse
EVNP - Enterovírus Não-Pólio
gr - Gramas
HEp2 - Célula do carcinoma epidemóide de laringe humana
HEV - Enterovírus Humano
HGJM - Hospital Geral José Macamo
HGM - Hospital Geral de Mavalane
HRV - Rinovírus Humano
ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses
IgM- Imunoglobulina M
INAM - Instituto Nacional de Meteorologia
IRES - Internal ribosome entry site
Kb - kilobyte
LCE - líquido cefalorraquidiano
LEV - Laboratório de Enterovírus
ml - Mililitros
MRC-5 - Célula diplóide humana
OMS - Organização Mundial de Saúde
ORF - Open Reading Frame
Pb - Pares de bases

PCR - Reacção em cadeia de polimerase
pH - Potencial do hidrogénio
Pmol - pico moles
PV - Poliovírus
PVR - Receptor de poliovírus
RD - Célula de Rbdomiosarcoma embrionário humano
RNA - Ácido ribonucleico
Rpm - Rotações por minuto
RT-PCR - Transcriptase reversa - Reacção em cadeia de polimerase
TAE - Tampão Tris-Borato-EDTA
TBE - Tampão Tris-Acetato-EDTA
UV - Ultravioleta
ViNaDiA - Vigilância Nacional das Diarreias Agudas
VP - Proteína estrutural
WHO - World Health Organization
5'NC - Região terminal não codificante do RNA 5'
3'NC - Região terminal não codificante do RNA 3'
°C - Graus célsius ≥ - Maior ou igual
µg - Microgramas
µl - Microlitros

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais

Os *enterovírus não pólio* pertencentes ao gênero *Enterovírus* e à família *Picornaviridae*, estão associados a doenças agudas e crônicas em humanos (Pallansch & Roos, 2001). A maioria das infecções por enterovírus são consideradas assintomáticas, porém, cerca de 1% delas pode causar doença severa com alta mortalidade e morbidade, principalmente em lactentes, crianças jovens e em indivíduos imunodeprimidos (Pallansch & Roos, 2001).

Os *Enterovírus* são vírus pequenos, medem cerca de 30 nm de diâmetro, contêm uma fita única de RNA e não possuem envelope. O capsídeo destes vírus é icosaédrico e contém 60 subunidades que consistem de 4 proteínas estruturais (*VP1 a VP4*). O RNA do enterovírus mede aproximadamente 7,5 kb de comprimento e codifica proteínas estruturais, RNA polimerase, outros polipeptídeos necessários à replicação viral, além de 2 regiões não traduzidas nas extremidades 5' e 3' da molécula de RNA (Ketsuriane & Parashar, 2009).

Com base nas sequências de nucleotídeos e de aminoácidos dos genes das proteínas virais, os *Enterovírus* foram sub-agrupados em sete espécies. A homologia das sequências na região 3' não codificada do genoma e a análise do gene da proteína *VP1*, permitiu que os Enterovírus que afetam os humanos fossem classificados em A, B, C e D (HEV-A a D) e Rhinovírus humanos (HRV-A a C) que abrangem um número crescente de sorotipos: Poliovírus (tipo 1 a 3); vírus coxsackie A (tipos 1 a 14, 16,17,19 a 22 e 24) e B (tipos 1 a 6), vírus echo (tipos 1 a 7, 9, 11 a 21, 24 a 27 e 29 a 33); e enterovírus numerados (tipos 68 a 71 e 73 a 109) e que constituem a maior preocupação na saúde pública (Oberste et al. 1999; Rao et al., 2013).

Os enterovírus estão entre os vírus mais comuns em todo o mundo. Em regiões de clima temperado, a incidência das infecções atinge o pico durante os meses de verão e outono (junho a outubro) e nos trópicos, a transmissão ocorre durante o ano todo (Khetsuriani & Parashar, 2009). Os factores predisponentes ao desenvolvimento de doenças causadas por enterovirus incluem sexo masculino, condição socioeconômica precária, residência em áreas urbanas, saneamento precário e condições de vida em aglomeração (Khetsuriani & Parashar, 2009).

Os enterovírus são encontrados no meio ambiente (p. ex. no esgoto, água, como em rios, lagos e outros reservatórios e na água do mar), pois são excretados em grandes quantidades através das fezes de pessoas infectadas (Khetsuriani & Parashar, 2009).

O período de incubação dos enterovírus é de 3 a 7 dias (podendo variar de 1 a 35 dias). A excreção dos enterovírus pelo indivíduo infectado começa ao final do período de incubação, sendo que os pacientes são mais infecciosos logo antes e pouco depois do surgimento da doença (Khetsuriani & Parashar 2009).

Os enterovirus podem causar doenças como a Poliomielite, Doença febril, Meningite asséptica, encefalite, erupções inespecíficas, Herpangina, doença da mão, pé e boca, Miocardite, Pancreatite, Pleurodinia, Infecções sistémicas neonatais, Infecção crónica em hospedeiro imunocomprometido, Conjuntivite hemorrágica aguda, Doenças respiratórias, Exantema, Pancreatite, Diarreias e varias outras doenças que podem afectar o sistema nervoso central resultando num quadro de Paralisia/Paresia flácida aguda. Também podem ser implicados em doenças crónicas severas como a diabetes mellitus tipo 1, cardiomiopatia congestiva e doenças neromusculares (Witsø et al, 2006; Khetsuriani & Parashar, 2009; Alves et al., 2014).

As doenças diarreicas são a maior causa de morbidade e mortalidade em lactentes e crianças jovens e adultos. A gastroenterite aguda (GEA) é a terceira causa de mortalidade em crianças menores de 5 anos de idade, especialmente nos países em desenvolvimento, representando cerca de 1.5 biliões de episódios e 1.5-2.5 milhões de morte anualmente no mundo (Parashar et al., 2003).

Quase todas as crianças sofrem vários episódios de diarreia durante os primeiros 7 anos de vida. Vários agentes etiológicos como vírus, bactérias, protozoários bem como agentes não infecciosos causam diarreia aguda (Rao et al., 2013) Dentre os agentes virais, o rotavírus, calcivírus, astrovírus e adenovírus contribuem para uma carga significativa da doença (Moraes & Castro, 2014).

1.1.1. Historial dos *Enterovírus*

A história das enteroviroses é similar a dos poliovírus. Na verdade, muitos dos marcos nos avanços científicos sobre poliovírus contribuíram de forma muito significativa para o estudo virologia(Pallansch & Roos, 2001).

Acredita-se que a poliomielite seja umas das doenças mais antigas que conhecida e pensa-se que a imagem de um jovem com um membro atrofiado, presente no interior de uma pirâmide, em uma região Egípcia no segundo milénio antes de Cristo, seja uma sequela da poliomielite (Johnson, 1998). As descrições clínicas da poliomielite foram feitas em 1800, com relatos de paralisia com febres. Em 1900, começa uma nova era na investigação sobre a poliomielite e começa o entendimento do mecanismo natural da infecção por esta doença. Wickman e colaboradores (1907) reconheceram a transmissão natural da poliomielite, a importância dos indivíduos assintomáticos na transmissão do poliovírus e o papel das infecções entéricas na patogênese da doença (Pallansch & Roos, 2001).

O papel do tracto gastro-intestinal no início e na disseminação do poliovírus foi mais tarde confirmado por Trask e colaboradores (1938) e, num estudo clássico, Landsteiner e Popper (1908) identificaram poliovírus como agente etiológico da poliomielite e desde então este joga um papel importante na biologia e na medicina (Hogle, 1985). Transmitiram com sucesso a doença clínica e a sua patologia através da inoculação de casos humanos no sistema nervoso central de macacos (Pallansch & Roos, 2001).

Apesar destes progressos, houve vários equívocos que inicialmente confundiram os cientistas e levaram a uma orientação errada dos esforços para tomada de medidas de prevenção. Baseado em outros estudos, Enders e colaboradores desenvolveram um estudo de base mostrando que o poliovírus pode se propagar em uma cultura de tecidos não neurais (Enders et al, 1949).

Estas investigações tiveram um grande impacto para toda virologia porque indicaram primeiro que o poliovírus replica-se em várias culturas celulares diferentes dos tecidos infectados durante a doença humana, e segundo, que o poliovírus destroi células com efeito citopático específico. Testes de neutralização mostraram que o Poliovírus existe em 3 serotipos e os testes serológicos confirmaram o facto de que muitos indivíduos infectados não manifestam doença clínica (Bodian, 1949; Pallansch & Roos, 2001).

Estas investigações levaram ao desenvolvimento de uma estrutura sólida para a preparação da vacina e esclareceram uma serie de dados desconcertantes tais como a presença aparente de segundos ataques da poliomielite. Seguidamente, várias vacinas foram produzidas, sendo as mais conhecidas a vacina inactivada Salk administrada pela via intamuscular (licenciada em 1955 nos estados unidos) e a

vacina viva atenuada Sabin (licenciada em 1961-1962), administrada pela via oral (Pallansch & Roos, 2001).

Os trabalhos com poliovírus tem tido um impacto significativo no campo da virologia molecular sendo o primeiro vírus completamente clonado e sequenciado (Racaniello & Baltimore, 1981; Kitamura et al, 1981), o primeiro vírus RNA animal para o qual foi construído um clone infeccioso (Racaniello & Baltimore, 1981), e o primeiro vírus humano que teve a sua estrutura tridimensional resolvida através de uma estrutura do raio X (Hogle et al, 1985).

Em 1989, Raniello e colaboradores identificaram o receptor do poliovírus (PVR), uma descoberta seguida pela geração de ratos que levam o receptor do poliovírus (PVR) como um transgene (Koike et al, 1991).

Os Coxackievirus do grupo A (CV-A) foram isolados pela primeira vez no ano de 1948 em coxackie, Nova York, durante uma epidemia de poliomielite em fezes de crianças com paralisia. Estes isolados foram obtidos através da inoculação de murganhos lactentes; a patogenicidade em murganhos diferenciou claramente estes vírus do poliovírus (Melnick et al, 1949).

No ano seguinte, coxackievírus do grupo B (CV-B) foram isolados a partir de casos de meningite asséptica. Isolados originais de coxackievirus A produziram miosites com paralisia dos membros traseiros em murganhos bebés, enquanto que coxackievirus do grupo B produziram uma infecção generalizada em murganhos bebés com miosites assim como o envolvimento do cérebro, pancreas e coração (Melnick et al, 1949).

Echovírus (E) foram isolados pela primeira vez de amostras de indivíduos assintomáticos (Robbins et al, 1951). Foi lhes atribuído este nome porque são isolados entéricos, causam efeito citopático em culturas celulares, foram isolados em humanos. Estudos subsequentes têm mostrado que echovirose causam realmente uma variedade de doenças em humanos (Apostol et al, 2012; Rao et al, 2013).

1.1.2. Propriedades físicas e químicas dos *Enterovírus*

Os membros do género *enterovírus* distinguem-se dos outros membros da família *Picornaviridae* através das suas propriedades físicas como a sua densidade no cloreto de céσιο e a sua estabilidade em ácidos fracos. Aspectos relacionados com a patologia, transmissão e epidemiologia geral dos enterovírus estão directamente

relacionados com as propriedades biofísicas e o ciclo de vida citolítico destes vírus (Corredor & Lago, 2016).

Os vírus infecciosos são relativamente resistentes a vários desinfectantes comuns de laboratório, incluindo o etanol a 70%, isopropanol, lisol diluído e compostos de amônio quaternário. Estes vírus são insensíveis a solventes de lípidos, incluindo o éter e o clorofórmio e são estáveis a vários detergentes a temperatura ambiente. Formaldeído, glutaraldeído, ácidos fortes, hipoclorito de sódio e cloro residual são substâncias que inactivam os enterovírus. A concentração, o pH, materiais orgânicos estranhos, e o tempo de contacto afecta o grau de inactivação por estes componentes. Uma similar inactivação é possível quando o vírus está presente em fomites, embora as condições podem não ser exactamente as mesmas (Abad et al, 1997). Em geral, muitos reagentes que inactivam os enterovírus são dependentes da modificação química activa do virião, enquanto que muitos solventes extractivos não têm efeito (Pallansch & Roos, 2001).

Muitos enterovírus são prontamente inactivados a 42°C, embora alguns agentes redutores sulfídricos possam estabilizar o vírus de modo a que seja relativamente estável a 50°C (Ackermann et al, 1990; Dorval et al, 1989). O processo de inactivação térmica envolve muitos passos culminando na libertação irreversível do RNA das partículas alteradas do virião. A relativa sensibilidade a elevações modestas de temperatura faz com seja possível usar a pasteurização para inactivar enterovírus em várias preparações biologicamente activas (Hilfenhaus & Nowak, 1994).

A luz ultravioleta pode ser usada para inactivar os enterovírus particularmente nas superfícies. O processo de secagem em superfícies reduz significativamente o título do vírus embora o grau de redução desse título seja relativo a porosidade da superfície e da presença de material orgânico (Abad et al, 1994).

A inactivação da infectividade pode ser possível em determinadas circunstâncias, entretanto, a PCR pode ser usada para amplificar o RNA viral mesmo depois da inactivação do vírus (Ma et al, 1994).

1.1.3. Estrutura dos *enterovírus*

Os EV são vírus RNA de cadeia simples de aproximadamente 7.4 kb que serve como modelo para a tradução de proteínas virais e para a replicação do RNA. O genoma

está dividido em quatro regiões: uma região longa não codificadora de aproximadamente 740 nucleotídeos chamada 5'NC, seguido de um quadro aberto de leitura (do inglês, ORF) de aproximadamente 6600 nucleotídeos. Em seguida, uma pequena região não codificante (possuindo entre 70 e 100 nucleotídeos) chamada 3'NC e finalmente uma cadeia terminal poliadenilada (Romero JR, 2007; Minor PD & Muir, 2009).

No interior da região 5'NC existe uma região que serve de porta de entrada no ribossoma (do inglês IRES) a qual permite a tradução directa da poliproteína. Além disso, esta região está ligada de forma covalente a uma pequena proteína denominada VPg, de aproximadamente 7 kb, necessária para a síntese de RNA. A região 3'NC também joga um papel importante na replicação de RNA viral (RicanIELlo, 2007; Knowles et al, 2012).

A ORF inicia aproximadamente no nucleótido 740 e termina no nucleótido 7370. O RNA actua como um mensageiro cujo produto de tradução é uma poliproteína de 250 kDa de peso molecular. Esta poliproteína é submetida a cortes específicos para formar três polipéptidos, P1, P2 e P3 (figura 1). A região P1 sofre clivagens sucessivas para formar o capsídeo viral (figura 2), formando cinco cópias de VP1, VP3 e VP0 (percursor de VP2 e VP4) dentro das subunidades, com a montagem posterior de 12 destes pentâmeros dentro de um capsídeo dodecaédrico completo (Romero JR, 2007; Minor & Muir, 2009).

A encapsulação de RNA viral está associada a clivagem final das proteínas VP0, VP2 e VP4. As regiões P2 e P3 codificam sete proteínas não estruturais (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C e 3D) que são essenciais para o ciclo de vida do vírus com as funções conhecidas, incluindo a actividade de polimerase, produtos de clivagem proteolítica de tradução e inibição da síntese de proteínas das células hospedeiras (Romero JR, 2007; Knowles et al, 2012).

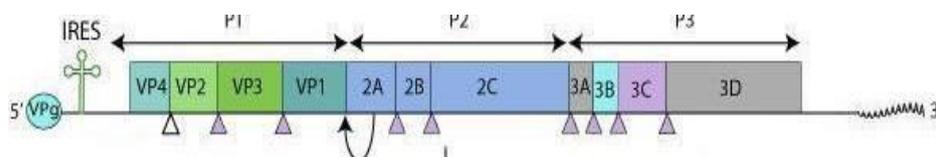


Figura 1 Esquema do genoma de enterovírus, mostrando suas diferentes regiões e locais de clivagem (referência: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html)

A cápside dos EV é composta por 60 cópias de cada uma das quatro proteínas não estruturais (VP1-VP4). Estas são organizadas em uma estrutura icosaédrica que tem

simetria de rotação 5: 3: 2. Cada uma destas quatro proteínas se associam para formar uma sub-unidade denominada protômero, na qual as três principais proteínas (VP1-VP3) estão dispostas na superfície do virião e o pequeno peptídeo VP4 se localiza no interior; a associação de 5 protômeros forma um pentâmero e a associação de 12 pentâmeros constitui o icosaédrico (Torres, 2015).

As proteínas do capsídeo tem as seguintes funções: 1) Proteger o RNA genômico de endonucleases ambientais; 2) Reconhecer os receptores celulares específicos, processo fundamental na determinação de hospedeiros e do tropismo celular;

3) Determinar a antigenicidade; 4) Emitir sinais de desmontagem para a libertação de empacotamento do RNA genômico durante a maturação do virião (Racaniello, 2007).

A síntese de RNA ocorre ao fim de 3 horas após a infecção. Depois de 6 a 7 horas, os viriões são visíveis dentro do citoplasma por microscopia eletrônica, e a sua posterior libertação por lise celular, resulta em uma carga de 10^4 a 10^5 viriões por célula (Romero JR, 2007; Minor & Muir, 2009).

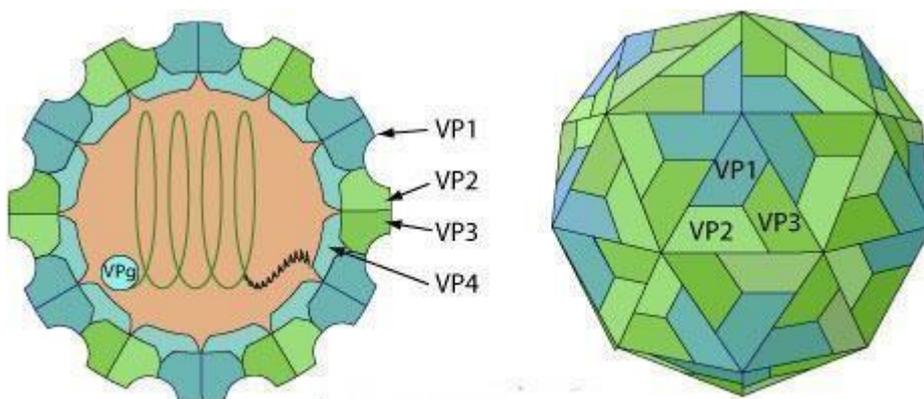


Figura 2 Estrutura do capsídeo de enterovírus

Estrutura do capsídeo de enterovírus (proteínas VP1, VP2 e VP3 vistos do lado exterior, enquanto que a proteína VP4 na face interna)

(Referência: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html)

1.1.4. Características Antigénicas

Os Enterovírus são vírus RNA simples com um capsídeo altamente estruturado. Apesar do material genético limitado, a evolução dentro destes *vírus* tem resultado

num grande número de membros distintos. Esta variabilidade foi categorizada antigenicamente como serotipos (Pallansch & Roos, 2001). Cada serotipo tem uma especificidade em relação a resposta imunológica do hospedeiro humano, a protecção contra a doença, o tipo de receptores do hospedeiro e a magnitude da doença clínica (Pallansch & Roos, 2001).

A classificação original dos enterovírus em poliovírus, coxsackievírus A e B e echovírus basea-se na capacidade de causar uma doença específica (poliovírus), na patogenicidade em camundongos lactentes (coxsackievírus) e no crescimento em culturas celulares (echovírus) (Faleye et al, 2016).

Apesar da distinção dos enterovírus baseada nas diferenças na antigenicidade e na patogenicidade em camundongos, o vírus coxsackie B e vários echovírus são geneticamente relacionados entre si como são os poliovírus e alguns coxsackievírus A (Mertens et al, 1983)

1.1.5. Propagação em culturas celulares

Uma das características mais relevantes dos EV é a sua natureza citolítica e de replicação em culturas celulares. Por muitos anos o Poliovírus foi protótipo da infecção lítica viral. Ao microscópio o efeito citopático característico pode ser observado dentro de 1 a 7 dias, onde se pode observar o arredondamento das células, encolhimento, picnose nuclear, refractilidade e degeneração celular (Pallansch & Roos, 2001).

Este efeito pode ser observado em menos de 24 horas se o inóculo tiver bastante partículas infecciosas, mas, pode levar vários dias a ser observado se o inóculo tiver pequeno número de viriões. Alguns enterovírus não causam efeito citopático ou só o fazem depois de várias passagens (Pallansch & Roos, 2001).

Em geral, uma vez observado um foco de efeito citopático, há uma rápida disseminação da infecção pelas células e uma total destruição da monocamada, às vezes só em algumas horas. A natureza do efeito citopático em várias linhas celulares é tão característico que torna-se possível fazer um diagnóstico presuntivo da infecção por EV logo no início das mudanças citopáticas, embora alguns componentes da amostra inoculada podem produzir um efeito tóxico nas primeiras 24h que pode se confundir com um efeito citopático viral (Pallansch & Roos, 2001).

Para dissipar as dúvidas, deve-se fazer uma passagem adicional para permitir que os componentes tóxicos da amostra possam ser diluídos, permitindo que a célula

mantenha a sua viabilidade ou que o vírus se amplifique e produza o efeito citopático. A infecção de células alvo depende da ligação dos vírus aos receptores específicos na superfície celular (Melnick, 1996).

Os EV usam um grande número de receptores. Isto tem-se verificado em numerosos serotipos incluindo o PVR, factor de aceleração do decaimento, e a molécula de adesão intercelular (Kuhn, 1997).

1.1.6. Infecção em animais de experimentação

O homem é o hospedeiro natural de todos os enterovírus humanos (Iwai et al,2010). Embora outros *Picornavírus* sorologicamente distintos, com as mesmas propriedades físicas que os enterovírus tenham sido encontrados em muitos animais, estes não causam infecções reconhecíveis ao ser humano. Por outro lado, alguns animais são susceptíveis à infecção experimental com enterovírus humanos (Poyry et al, 1999).

Estes incluem primatas não-humanos e camundongos transgênicos PVR para poliovírus, ratos e alguns macacos para o vírus Coxsackie A e B, e macacos para echovirus. A infecção de primatas por enterovírus humano parece ser em grande parte subclínica, talvez relacionada com a homologia que vários enterovírus símios compartilham com os vírus humanos (Poyry et al, 1999).

Entre os primatas superiores, chimpanzés e gorilas parecem ser capazes de adquirir a infecção do poliovírus e desenvolver a doença dos seres humanos através duma exposição natural ao vírus (Douglas, 1970). Pelo menos um enterovírus humano, coxsackievirus B5, está antígenicamente relacionado ao enterovírus porcino que causa a doença vesicular dos suínos, com cerca de 50% de homologia genética (Zhang,1999).

Estudos genéticos de uma série de estirpes de vírus da doença vesicular dos suínos e a informação epidemiológica adquirida a partir de surtos sugerem fortemente que um coxsackie B5 humano foi especificamente introduzido em suínos há várias décadas (Zhang,1999).

Embora a maioria dos vírus coxsackie A são cultivados com sucesso em vários sistemas de cultura de células, o isolamento a partir de amostras clínicas é, por vezes, sem sucesso, sendo necessária a inoculação em camundongos lactentes. A

inoculação de ratinhos lactentes e a subsequente identificação do vírus é um processo semelhante ao da inoculação de cultura células. Os dois grupos de vírus coxsackie podem ser distinguidos pela patologia distinta que eles causam em ratos (Pallansch & Roos, 2001).

Quando infectados com o vírus coxsackievirus A, os camundongos recém-nascidos desenvolvem paralisia flácida e grave degeneração do músculo esquelético (poupando a língua, coração e sistema nervoso central), e eles podem ter lesões renais. A morte geralmente ocorre dentro de uma semana (Pallansch & Roos, 2001). A infecção por Coxsackie B prossegue mais lentamente e é caracterizada por paralisia espástica e tremores associados com encefalomielite, miosite focal, miocardite, hepatite, pancreatite e células acinares. Os Echovirus, com exceção de alguns isolados de echovírus tipo 9, geralmente não causam doença em camundongos (Pallansch & Roos, 2001).

1.1.7. Classificação dos EV humanos

Os EV humanos foram inicialmente classificados em 4 grupos tendo como base os padrões de replicação em cultura de células e suas manifestações clínicas em humanos e as manifestações observadas ao serem inoculados por via intracraniana em ratinhos lactentes. (Romero JR, 2007; Minor & Muir, 2009; Knowles et al, 2012).

Estes grupos são:

- 1) o poliovírus (PV) agentes que causam a poliomielite em seres humanos, geralmente não patogénica em ratinhos;
- 2) coxsackie A (CVA) associado com as doenças do sistema nervoso central, erupções da pele em seres humanos, e causadores da paralisia flácida em ratinhos;
- 3) coxsackie B (CVB) associado com doença do sistema nervoso central e doenças cardíacas em seres humanos e causam paralisia asséptica em ratinhos;
- 4) echovírus (E) os quais não causavam doença humana conhecida e não eram patogênicos em camundongos (Romero JR, 2007; Minor & Muir, 2009; Knowles et al, 2012).

Embora estes critérios foram úteis por um longo tempo, o surgimento de novos EV e o desenvolvimento de novas linhas de células deixava cada vez mais difícil qualificação, razão pela qual novos sorotipos reconhecidos como enterovírus eram numeradas consecutivamente a partir de EV68 (Romero JR, 2007; Minor & Muir, 2009; Knowles et al, 2012).

Alguns enterovírus, principalmente echovírus (E) foram inicialmente classificados de forma errada. Por exemplo, E8 e E1 são o mesmo serotipo, E10 é agora reovírus 1, E28 é agora rinovírus humano 1A, E22 é agora parechovirus humano 1 e E23 é agora parechovirus humano 2. Do mesmo modo foi determinado que CVA23 e E9, CVA15 e CVA11, CVA18 e CVA13 são o mesmo sorotipo. O vírus da hepatite A1 (HAV-1; género Hepatovírus) foi originalmente nomeado como enterovírus 72; rinovírus humano 87 é considerado uma variante do EVD68 (Romero, 2007).

Nos últimos anos os métodos de biologia molecular permitiram a classificação dos EV de uma forma mais clara, principalmente por meio de análise filogenética com base nas sequências completas do gene que codifica a proteína VP1 do vírus, a principal proteína da cápside do EV, facto que tem levado ao aumento do número de sorotipos ano após ano (Romero, 1999; oberste,2003).

De acordo com a Comissão Internacional para a Taxonomia de Vírus (ICTV) este género é dividido em 12 espécies. Os enterovírus diferem segundo a sua afinidade para um tipo de célula, propriedades antigénicas e os receptores celulares. No entanto, em todos os casos o habitat natural e o local de replicação primário é o tracto gastrointestinal (Torres, 2015)

Tabela 1: Classificação actual dos EV humanos

Nomenclatura actual	Nr de serotipos
Enterovírus A	24
Enterovírus B	61
Enterovírus C	23
Enterovírus D	5
Rhinovirus A	80
Rhinovirus B	32
Rhinovirus C	53

Fonte: Comité Internacional para a Taxonomía dos Virus (Knowles N.J et al., 2012)

1.1.8. Transmissão dos Enterovírus

Os enterovírus são predominantemente transmitidos pela via fecal-oral, embora alguns tenham uma outra via de transmissão como é o caso do coxsackievírus

A21(causador de infecções respiratórias), que se transmite por via intranasal ou por aerossóis e o EV70 (causador de conjutivite hemorrágica aguda) que se propaga por contacto directo com secreções oculares contaminadas e causam doença em humanos de todas as idades embora as infecções sejam mais frequentes em crianças menores de 5 anos (Oyero et al, 2014).

A transmissão fecal-oral pode predominar em áreas com condições sanitárias precárias, ao passo que transmissão respiratória pode ser importante em áreas mais desenvolvidas e têm sido reportados casos de diarreia esporádica em estudos epidemiológicos (Harada et al., 2009).

Estes vírus replicam-se inicialmente na mucosa da faringe e no intestino; esta replicação normalmente é detectável dentro de 1 a 3 dias. Seguidamente os vírus propagam-se para os nódulos linfáticos mesentéricos entrando na corrente sanguínea (virémia menor) com uma subsequente invasão dos tecidos do sistema reticuloendotelial (nódulos linfáticos, fígado, baço e medula óssea), (Pallansch & Roos, 2001).

Nesta fase o sistema nervoso central pode ser invadido se o sistema imunológico do hospedeiro não conseguir conter a replicação viral, mas a doença do SNC tem mais probabilidade de ocorrer depois da amplificação nos tecidos do sistema reticuloendotelial resultando numa “virémia maior”. Muitos indivíduos infectados por enterovírus controlam a infecção antes da “virémia maior” resultando numa infecção assintomática (Ketsuriane & Parashar, 2009).

O período de incubação dos enterovírus é de 3 a 7 dias, podendo variar de 1 a 35 dias. Em crianças este período pode ser menor e associado a algumas manifestações clínicas específicas. Os indivíduos infectados começam a excretar o vírus no final do período de incubação, sendo que os pacientes são mais infecciosos pouco antes e pouco depois da manifestação da doença. Estes vírus podem ser encontrados nas secreções da faringe, nas fezes, sangue, líquido de vesículas e no líquido cerebrospinal (LCE) dependendo do estágio da doença (Dhole et al, 2009). A liberação do vírus nas secreções da faringe e na circulação sanguínea ou LCE normalmente dura 1 semana (em hospedeiros imunocompetentes) mas a excreção fecal pode durar até 2 meses mesmo após a resolução dos sintomas clínicos. Em indivíduos imunocomprometidos, os enterovírus podem persistir por muito mais tempo ou até por muitos anos (Ketsuriane & Parashar, 2009).

1.1.9. Tropismo celular e tecidual

Uma característica particular de patogênese do poliovírus é a vulnerabilidade selectiva do neurónio motor à infecção por poliovírus. Embora a expressão dos receptores de poliovírus (PVR) influencie na distribuição da infecção por poliovírus (por exemplo, as células gliais não expressam PVR e não são infectadas pelo vírus), parece que a correlação entre a expressão do PVR num tecido particular e a distribuição de vírus no mesmo após inoculação intracerebral e intravenosa é desproporcional (Namoto, 1994).

Por exemplo, existem níveis mais elevados de PVR expresso em fígado humano, pulmão e coração do que no cérebro, apesar do facto de que estes tecidos viscerais normalmente não estão relacionados com a infecção por poliovírus. Outros factores como a via de inoculação, o tecido hospedeiro, factores específicos de células, e os elementos genómicos virais desempenham um papel importante na infecciosidade viral (Namoto, 1994).

As proteínas da cápside de poliovírus que interagem com o receptor celular também podem afectar o tropismo. (Pallansch & Roos, 2001).

A região IRES desempenha um papel fundamental na neurovirulência pois, sendo uma parte da região 5' não traduzida que afecta a eficiência da replicação viral pode também influenciar o tropismo e a virulência (Gromeier et al, 1999).

1.1.10. Resposta Imune

O sistema imunológico é importante numa infecção por enterovírus, pois, no caso de infecção este joga um papel preponderante na protecção e aquisição duma imunidade duradoura (Pallansch & Roos, 2001).

A resposta de anticorpos neutralizantes contra o poliovírus foi caracterizada pela geração de anticorpos monoclonais neutralizantes, em seguida pelo crescimento do vírus na presença do anticorpo para produção de anticorpos monoclonais resistentes ao vírus, e, finalmente, pela identificação do epítipo de neutralização do vírus por sequenciamento da região de codificação para as proteínas da cápside do vírus (Hogle et al, 1985).

Os locais de neutralização são locais antigénicos idênticos geralmente não consecutivos, que correspondem a terminais expostas nas proteínas da cápside subindo a partir da superfície dos vírus; algumas regiões localizadas no interior do

vírus nativo, também podem funcionar como locais de neutralização (Hogle et al, 1985).

Com base nesta abordagem, um número limitado de locais principais de anticorpos neutralizantes foi identificado no caso de poliovírus do tipo 1: a terminal BC de VP1; um site complexo, incluindo resíduos de 220 a 222 de VP1 (local 2a) e resíduos 169 e 170 e outros de VP2 (local 2b); um local complexo, incluindo os resíduos 286 a 290 de VP1 (local 3a); e os resíduos 58 e 59 e outros em VP3 (local 3b) (Minor et al, 1986). Embora apenas um número limitado de estudos tenha sido realizado para identificar os locais de neutralização de enterovírus não pólio, os resultados sugerem semelhanças na localização dos seus sítios antigénicos aos encontrados no poliovírus (Pallansch & Roos, 2001).

1.1.11. Imunopatologia dos enterovírus

Numa infecção por enterovírus, a resposta das células B e T jogam um papel preponderante embora algumas infecções podem levar à doença. Para a imunopatologia de algumas doenças causadas por enterovírus existem algumas razões a considerar:

- 1- As doenças induzidas por enterovírus têm patologia inflamatória;
- 2- Os modelos animais experimentais para doenças induzidas por enterovírus demonstram a importância da sua susceptibilidade genética e a eficácia do tratamento com drogas imunossupressoras; e
- 3- As doenças causadas por enterovírus estão relacionadas com doenças humanas que se consideram ter uma contribuição auto-imune.

Certas situações têm sido verificadas na doença auto-imune induzida por vírus. No primeiro caso, uma resposta imunitária dirigida contra o vírus reage de modo cruzado com uma proteína celular e causa a doença. No outro caso um vírus regula respostas imunológicas não específicas que conduzem a patologia (Pallansch & Roos, 2001).

A activação de células T de repouso auto-reactivas pode ser induzida por citocinas ou outros factores, tais como a libertação de auto-antígeno. A presença de

citocinas pró-inflamatórias, então, activa as células Th1 ou macrófagos que promovem imunopatologia (Pallansch &Roos, 2001).

1.1.12. Epidemiologia

Os enterovírus são encontrados na superfície e nas águas subterrâneas em todo o mundo. Nos trópicos o tempo de vida destes é mais longo nas águas subterrâneas pois são mais frias. Os enterovírus são regularmente também encontrados em esgotos, em áreas de baixo nível socioeconómico e no solo (Pallansch &Roos, 2001).

Embora os enterovírus humanos possam ser isolados de várias fontes ambientais, o homem é o único reservatório natural destes vírus. A sobrevivência destes no ambiente não vai além de algumas semanas, embora em certos casos estes possam sobreviver por alguns meses, mas para que isso aconteça certas condições ambientais como o pH neutro, umidade, baixa temperatura e presença de matéria orgânica , devem estar presentes (Romero, 1999).

Um dos determinantes importantes da infecção por EV é a idade. A severidade da infecção está associada a factores como idade, género, receptores das membranas das células hospedeiras e do ambiente, justificando-se assim a alta prevalência em crianças de baixa classe económica. A susceptibilidade a infecção, a magnitude da doença, as manifestações clínicas variam de acordo com a faixa etária (Da silva et al, 2005; Lo et al, 2010).

A maior quantidade e o maior período de excreção do vírus ocorre na infecção primária e depende do serotipo de enterovírus. Muitas infecções primárias ocorrem durante a infância, por isso as crianças são provavelmente os maiores transmissores de enterovirose, particularmente dentro dos agregados familiares. Estas também têm sintomas clínicos significativos provavelmente por causa da maior exposição ao vírus durante a infecção (Pallansch & Roos, 2001; Ferreira et al, 2012).

Alguns estudos mostram que o sexo masculino é mais susceptível a infecções e doenças por enterovírus (Moore et al, 1984; Gondo et al, 1995).

As infecções por enterovírus são mais frequentes em indivíduos de baixo nível socioeconómico e em indivíduos vivendo em áreas urbanas e ou com saneamento do meio precário (Hall et al, 1970; Jenista et al, 1984).

A ocorrência de surtos causados por enterovírus tem um padrão sazonal diferente. Em climas temperados as enteroviroses ocorrem durante o verão e outono embora os surtos podem continuar até o inverno, enquanto que nos climas tropicais e semitropicais a ocorrência tende a ser ao longo de todo ano ou associada com a estação chuvosa (Pallansch & Roos, 2001).

1.1.13. Prevalência e incidência da doença

Dados de incidência sobre as doenças causadas por determinados tipos de enterovírus podem ser derivados de uma vigilância longitudinal em perspectiva de uma população definida, ou uma amostra da população, em que a ocorrência de doença e/ou infecção pode ser determinada de forma fiável (Kogon et al, 1969). O programa de Vigilância de Vírus na década de 1960 nas cidades dos Estados Unidos exemplifica este tipo de estudo de vigilância, em que amostras de crianças sujeitas foram obtidas a cada 2 semanas para avaliação virológica. Os estudos prospectivos de coorte são difíceis e extremamente caros, mas, evitam muitas das armadilhas de vigilância passiva, e permitem interpretações sobre infecção e incidência da doença (Kogon et al, 1969; Cooney, 1972).

1.1.14. Manifestações clínicas

A maioria das infecções por enterovírus são assintomáticas com cerca de 1% delas podendo causar doença severa com alta mortalidade e morbidade, principalmente em lactentes, crianças jovens e em indivíduos imunodeprimidos (Rao et al, 2013). Isto deve-se a vários factores como a virulência do sorotipo viral, a dose infectante, a idade, o sexo, o mecanismo de entrada no hospedeiro, o tropismo por determinados órgãos e o estado imunológico do hospedeiro (Da Silva et al, 2005).

1.1.15. Doenças associadas aos Enterovírus

A tabela 2 abaixo mostra algumas doenças associadas a enterovírus.

Tabela 2: Doenças associadas as infecções por Enterovírus

Doença	Sinais clínicos	EV associados
Poliomielite	Paralisia flácida, problemas respiratórios, gripe, febre, dor de garganta, náusea, vômito, dor abdominal e raramente, diarreia	Pólio, coxsackie A7, coxsackie B, Echovirus, EV70, 71
Meningite asséptica	Febre, dor de cabeça, rigidez da nuca, confusão mental, vômitos, fotofobia e fonofobia. As vezes, em crianças pequenas podem-se observar apenas sintomas inespecíficos como irritabilidade e sonolência	Pólio, coxsackie A, coxsackie B5, Echovirus, EV71
Encefalite	Febres, dor de cabeça, fotofobia, fraqueza, convulsões, vômitos. Com menos frequência pode ocorrer a rigidez do pescoço, dos membros, lentidão nos movimentos, alucinações e má coordenação motora.	Polio, coxsackie A, coxsackie B5, Echovirus 6,9,11,24,30, EV71
Herpangina	Febre, dor de cabeça, mal-estar, dor de garganta. Doença autolimitante	coxsackie A2,4,5,8,10,16
Miopericardite	Dispneia, dor torácica, febre, mal-estar; anormalidades de ECG (elevação do segmento ST, segmento ST inespecífico e anormalidades de onda T, taquiarritmias ventriculares e bloqueio cardíaco); cardiomegalia; níveis séricos de enzimas miocárdicas	Coxsackie A4, 16; Coxsackie B; Echo 9, 22
	frequentemente aumentados	
Pleurodinia	Dores musculares, febres, inchaço, mialgia epidémica	Coxsackie B
Infecção sistêmica neonatal	letargia, dificuldade de amamentação, vômito, presença ou ausência de febre, diarreia, anorexia, miopericardite, dificuldade respiratória como dispneia, e dificuldade cardíaca	Coxsackie B; Echovírus11

Infecção EV crônica em hospedeiro imunocomprometido	infecção persistente e crônica do SNC (meningoencefalite), músculos esqueléticos (síndrome dermatomiosite-símile) e outros órgãos	Echovírus
Conjuntivite hemorrágica aguda	Dor ocular aguda, fotofobia, inchaço das pálpebras, hemorragias subconjuntivais; possibilidade de envolvimento transiente da córnea	Variante de coxsackie 24; EV70
Doenças respiratorias	Doença febril aguda; coriza, faringite, bronquite, traqueobronquite, bronquiolite, pneumonia	Coxs A21, A24; Echo4,9,11,18
Diarreia	Diarreia febril, acompanhando outros sintomas de infecção por enterovírus; recuperação total	Coxs A e B; Echo 11, 14, 18
Doença da mão, pé e boca	febre e faringite leve	Coxs A16; EV71
Erupções inespecíficas	Variedade de exantemas e enantemas	Coxs A e B; Echo 9, 11, 16; EV enumerados
Doença febril	Doença febril leve, transiente, com ou sem erupções ou sintomas respiratórios	Polio; coxs A, B; Echo, EV enumerado

Fonte: Ketsuriane & Parashar 2009

1.1.16. Diagnóstico

1.1.16.1. Diagnóstico diferencial e presuntivo

O processo de diagnóstico de uma infecção por enterovírus pode ser complicado e difícil por causa da biologia e da epidemiologia de infecções por enterovirus, bem como das limitações das metodologias de diagnóstico actuais. Embora seja possível demonstrar que uma pessoa está infectada por enterovírus, esta associação não

prova necessariamente que o enterovírus é a principal causa da doença (Pallansch & Roos, 2001).

Por outro lado, um diagnóstico presuntivo em certas situações epidemiológicas e clínicas pode ser possível com um elevado grau de certeza por motivos clínicos. Várias propriedades biológicas podem complicar o diagnóstico da doença induzida por enterovírus:

- A primeira é que a replicação e a infecção da maioria dos vírus ocorre normalmente no tracto respiratório e gastrointestinal. Estas infecções são frequentemente assintomáticas, com poucos ou nenhuns sinais clínicos sistêmicos. Uma vez que estas infecções são extremamente comuns, mesmo a amostragem aleatória de indivíduos saudáveis pode demonstrar infecções por enterovírus a taxas substanciais. Por esta razão, a detecção de vírus a partir de certos sítios não estéreis não estabelece uma ligação firme à doença, e pode ser meramente uma coincidência.
- A segunda é que, mesmo quando a doença resulta de uma infecção por enterovírus, a maioria dos sinais e sintomas são relativamente genéricos e geralmente carecem de especificidade. Isto é, muitas vezes a razão de um diagnóstico de doença induzida por enterovírus não é considerado até que outras etiologias sejam excluídas e muitas vezes até que isso aconteça já não há disponibilidade da amostra. A colecta de amostras clínicas apropriadas para o isolamento do vírus é fundamental para a confirmação laboratorial da infecção por enterovírus (Pallansch & Roos, 2001).

1.1.17. Diagnóstico laboratorial

1.1.17.1. Isolamento viral

O diagnóstico é geralmente feito usando culturas celulares e através da soroneutralização. As técnicas tradicionais de detecção e caracterização de enterovírus são procedimentos demorados e de trabalho intensivo de isolamento viral em cultura celular e neutralização por anti-soros de referência e as vezes pode falhar dependendo do número de partículas virais presentes na amostra, antigenicidade ou a presença de outros tipos de vírus na mesma amostra (Oberste et al, 2000).

O isolamento dos enterovírus a partir de amostras utilizando linhas celulares apropriadas, pode levar de 7 a 28 dias e continua a ser o método muito sensível para a detecção destes vírus. As melhores amostras para o isolamento do vírus são: fezes, zaragatoas rectais, esfregaços da garganta ou de lavagem, e o líquido cefalorraquidiano (Melnick, 1996; Dhole et al, 2009).

Lavados de garganta e fluído cerebrospinal são melhores para o isolamento de vírus se forem obtidos na fase aguda da doença. Para os casos de conjuntivite hemorrágica aguda, as melhores amostras são zaragatoas da conjuntiva (Pallansch & Roos, 2001). Infelizmente, não há uma linha única de células susceptível para todos os enterovírus humanos. Geralmente, usam-se vários tipos de linhagens celulares de humanos e primatas para aumentar o espectro de vírus que pode ser detectado. No entanto, mesmo com uma variedade de células, continuam a existir vários sorotipos de Coxsackie A que não conseguem propagar-se em cultura. Estes, incluindo aqueles que não se replicam em cultura de células, podem ser isolados e propagados em ratinhos lactentes (Oberste et al, 1999; oberste et al, 2000). Quando as amostras clínicas são inoculadas em linhas celulares, observa-se um efeito citopático característico de infecção por enterovírus que consiste na redução do tamanho e arredondamento das células dentro da monocamada. Em seguida, o núcleo de células infectadas tem picnose. Quando a infecção progride a célula degenera-se e é separada da superfície da placa (Torres, 2015).

O isolamento do vírus com subsequente sorotipagem tem sido tradicionalmente o padrão-ouro do diagnóstico laboratorial das infecções por enterovírus, recomendado pela Organização mundial de Saúde (OMS).

Em muitos laboratórios de pesquisa os métodos sorológicos estão sendo substituídos por RT-PCR e sequenciamento parcial ou completo da região VP1 (Oyero et al, 2014).

A RT-PCR em comparação com a cultura celular, tem se mostrado mais sensível, específica e bem mais rápida. A tipagem molecular por análise de sequência, baseada na estreita correlação do sorotipo com a sequência de nucleotídeos do gene VP1, constitui uma nova modalidade de identificação de enterovírus que tem levado ao reconhecimento de vários sorotipos até então desconhecidos (Khetsuriani & Parashar, 2009).

1.1.17.2. Testes sorológicos

O teste sorológico mais básico é o de neutralização em cultivos de células. Muitos estudos sorológicos baseiam-se na detecção de anticorpos IgM como evidência de uma infecção recente por enterovírus, e este é agora amplamente usado como uma alternativa ao teste de neutralização e fixação de complemento. Nas últimas décadas, foi desenvolvido um teste ELISA específico para IgM-enterovírus (Bell et al, 1986; Magnius et al, 1988; He et al, 2013).

Este teste foi positivo para cerca de 90% das infecções confirmadas por cultura celular do vírus coxsackie B, e pode ser realizado rapidamente. O teste ELISA tem sido aplicado com sucesso para investigações epidemiológicas de surtos bem como para utilização em diagnóstico específico. Um resultado positivo tanto com o teste de neutralização ou IgM ELISA indica uma infecção viral recente. No entanto, o serotipo infectante encontrado no ensaio de IgM pode não ser o mesmo encontrado pelo teste de neutralização (Goldwater et al, 1995).

1.1.17.3. Detecção molecular

A aplicação de técnicas de biologia molecular para virologia clínica começou a mudar significativamente as abordagens para o diagnóstico de enterovírus. Estes testes baseiam-se na reacção em cadeia da polimerase (RT-PCR), que é usado principalmente para detectar o genoma dos enterovírus em culturas de células, amostras clínicas e de biópsia ou necrópsia de tecidos (Pallansch & Roos, 2001). Outros baseiam-se na hibridação de sondas de ácido nucleico e são utilizados tanto para a detecção como para a caracterização, embora geralmente com menos sensibilidade de reacção em cadeia da polimerase (Pallansch & Roos, 2001).

O terceiro e mais novo procedimento utiliza o sequenciamento genómico para a caracterização de enterovírus nos mais altos níveis de especificidade. A principal vantagem do teste da PCR pan-enterovírus é que torna possível a detecção rápida de EV, mesmo com quantidades muito pequenas de amostra e também é possível detectar EV que não crescem rapidamente em cultura de células (Romero, 1999; Pallansch & Roos, 2001).

1.1.18. Prevenção e controle de EV

Não existe actualmente uma droga para tratamento clínico de infecções por EV. Contudo, tem sido reportado uma efectividade de uma variedade de drogas in vitro assim como em animais de experimentação e estão em curso uma série de ensaios. As pessoas com doença leve causada pela infecção por enterovírus não-pólio normalmente só precisam de tratamento dos sintomas. Eles geralmente se recuperam completamente. No entanto, algumas doenças causadas por enterovírus não-pólio podem ser graves o suficiente para exigir a hospitalização (Pallansch & Roos, 2001). Não existe ainda uma vacina capaz de prevenir a infecção por EV não-pólio e uma vez que muitas das pessoas infectadas são assintomaticas torna-se difícil evitar a disseminação do vírus. Mas, algumas medidas higiénicas podem ajudar a minimizar o problema: - lavar as mãos frequentemente com água e sabão antes das refeições, depois de usar a casa de banho e trocar fraldas, evitar contacto directo com pessoas doentes, limpeza e saneamento do meio, etc... (Pallansch & Roos, 2001).

1.1.19. Distribuição geográfica dos EV

Os EV têm uma distribuição mundial, variável dependendo do clima, região, idade e nível socioeconómico. Geralmente as infecções ocorrem ao longo do ano, mas em climas temperados, as maiores taxas ocorrem na época mais quente. Em climas tropicais, as infecções por EV ocorrem durante todo o ano com um aumento na incidência durante a estação chuvosa. Esta sazonalidade nunca foi satisfatoriamente explicada, mas temperaturas elevadas podem favorecer a presença de EV nas águas e no ambiente (Modlin,2010).

1.2. Justificativa

De acordo com o Inquérito demográfico de saúde 2011, em Moçambique, a diarreia é a terceira causa de morte em crianças menores de 5 anos de idade e estima-se que mais de 13000 crianças morram anualmente devido a esta infecção (IDS, 2011). Entretanto, existe pouca informação sobre a carga nacional dos principais agentes entéricos causadores de diarreias.

A diarreia foi reportada como sendo a 3ª causa de mortalidade (cerca de 10%) em crianças dos 0 aos 14 anos na cidade de Maputo (Mandomando et al., 2006), onde os dados disponíveis sobre a etiologia da diarreia infecciosa em áreas rurais ainda são escassos. Esses dados são uma ferramenta importante no planeamento e implementação das estratégias de redução da morbidade e mortalidade infantil causada por diarreias no nosso país (Mandomando et al., 2006).

Cerca de 30 a 40% de casos de diarreia são de etiologia desconhecida e embora muitos enterovírus (EVs) sejam transmitidos por via fecal-oral e replicam-se nas células intestinais, a sua associação com diarreia aguda, até agora não foi reconhecida devido à falta de uma investigação epidemiológica e laboratorial detalhada (Rao et al., 2013).

O estudo de Bero e colaboradores, 2015, realizado no Hospital Geral de Mavalane na cidade de Maputo, reportou uma frequência de 14,6% de enterovírus, detectados em amostras fecais de crianças menores de 15 anos, que apresentassem sinais ou sintomas compatíveis com a infecção por enterovirus tais como a dor de cabeça, febres, diarreia, prostração, resfriado comum, tosse, dores musculares, deficiência motora, obstipação, vômitos/náusea, conjuntivite, exantema, pequenas vesículas ou pústulas vermelhas (nos pés, mãos e boca), rigidez na nuca, convulsões, dificuldade respiratória, etc...

Estes resultados revelam a existência de sorotipos de enterovírus circulando no nosso país, o que nos leva a crer numa maior probabilidade de detecção de enterovírus na nossa população de estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a presença de enterovírus não-pólio em amostras de fezes de crianças menores de 15 anos com diarreia aguda na cidade de Maputo.

2.2. Objetivos Específicos

- Detectar a presença dos enterovírus não-pólio em amostras de fezes através da RT-PCR e Real Time PCR;
- Isolar o vírus através da inoculação em culturas celulares susceptíveis aos enterovírus;
- Identificar os sorotipos de enterovírus não pólio isolados por sequenciamento nucleotídico da região VP1;
- Descrever a sintomatologia clínica associada a infecção por enterovírus não-pólio em crianças com diarreia aguda;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de estudo

Moçambique está localizado no sudeste do continente Africano. O clima do país é tropical e húmido, influenciado pelo regime de monções do Índico e pela corrente quente do canal de Moçambique, com estações secas de Maio a Setembro e chuvosa entre Outubro e Abril. A precipitação média nas montanhas ultrapassa os 2000 mm. A humidade relativa é elevada situando-se entre 70 a 80%, embora os valores diários cheguem a oscilar entre 10 e 90%. As temperaturas médias variam entre 20°C no Sul e 26°C no norte, sendo os valores mais elevados durante a época das chuvas (INAM, 2015).

A cidade de Maputo está localizada no sul de Moçambique. O clima de Maputo é o tropical seco. O período mais quente do ano compreende os meses de Novembro a Abril e o mais frio os meses de maio a outubro. O período de maior precipitação ocorre nos meses mais quentes, entre Novembro e Março. A humidade relativa média é de 66,6%, com pouca oscilação durante o ano. O mês com maior humidade relativa é Março com 71,0%, e o mês como menor humidade é Junho com 63,5%. As temperaturas médias em Maputo variam entre os 13-24°C em Julho a 22-31°C em Fevereiro (INAM 2015).

Segundo o censo de 2007, a cidade de Maputo possui uma população de 1.178.116 de habitantes.

Este estudo foi realizado nos Hospitais gerais de Mavalane e José Macamo. O hospital geral José Macamo existe desde 1922, é um hospital de nível secundário, segundo decreto ministerial lei no 25/91, de 31 de dezembro. O hospital geral José Macamo é a unidade sanitária de referência para nove (9) centros de saúde, dos quais três (3) centros de nível "A" e seis (6) de nível "B" distribuídos em 23 bairros correspondentes a quatro (4) zonas sanitárias. Para além destas unidades sanitárias, o hospital atende mais de 50% de pacientes provenientes das unidades sanitárias da provincia de Maputo (sector de estatística do HGJM, 2015).

O hospital geral de Mavalane está localizado no bairro de Mavalane na cidade de Maputo e é responsável pela área de saúde de Mavalane. Esta área compreende os

distritos urbanos kampfumo, Kamaxaquene, Kamavota e o distrito urbano nr. 7. Esta área de saúde possui 8 centros de saúde e 7 postos de saúde. A área de saúde de Mavalane é a maior da cidade de Maputo e atende cerca de 609.889 habitantes (HGM, 2015).

3.2. Aspectos Éticos

Este é um sub-estudo derivado da Vigilância Nacional de Diarreias Agudas (ViNaDiA) e irá apenas tratar dos Enterovírus. O protocolo ViNaDiA tem aprovação do Comité Nacional de Bioética em saúde de Moçambique com a seguinte referência: 348/CNBS/2013

Os critérios de inclusão e exclusão, bem como a recolha de dados clínicos e epidemiológicos, foram conforme vem descrito no protocolo VINADIA (Pts 3.4 e 3.5).

3.2.1. Consentimento informado

Uma vez identificadas as crianças elegíveis, o consentimento informado foi obtido dos pais ou cuidador responsável primário da criança antes que qualquer actividade fosse conduzida. O consentimento foi assinado somente depois dos pais ou cuidadores terem recebido informações detalhadas sobre o estudo através de um membro da equipe de estudo e demonstrarem uma compreensão completa. Consentimento informado foi escrito em um formato de simples compreensão e foi administrado utilizando a língua local para os pais que não sabiam ler e em Português para os alfabetizados. Para os pais ou cuidadores que não sabiam ler e escrever, o consentimento foi administrado na presença de uma testemunha que também assinou o documento. Após a sessão de informação, o pai ou cuidador principal teve oportunidade de fazer perguntas.

Dois documentos foram assinados ou impressões digitais recolhidas do pai/responsável pela pessoa que administrou o consentimento. Um dos documentos assinados e impressos foi enviado para o INS juntamente com as amostras e outro foi entregue ao pai ou principal cuidador.

O consentimento foi administrado por enfermeiros treinados em Boas práticas clínicas.

3.3. Desenho do estudo

Este é um estudo descritivo transversal. É um subestudo do macroprojecto Infecções Gastrointestinais. Foram incluídas amostras fecais de crianças que reuniam os critérios de inclusão, e que os responsáveis legais consentiram sua participação no estudo, através do termo de consentimento livre e esclarecido. Para serem incluídas no estudo as crianças deviam ter como principal motivo para deslocar-se ao centro de saúde a Gastroenterite Aguda.

3.4. Critérios de inclusão

Foram incluídas neste estudo crianças dos 0 aos 14 anos de idade, que apresentavam três (3) ou mais dejetões nas últimas 24 horas, de consistência mole ou aquosa, com duração da diarreia inferior a 14 dias.

A diarreia era considerada grave se a criança apresentasse: olhos mais encovados do que o normal, perda do turgor para pele, recebesse rehidratação venosa, disenteria (diarreia com sangue visível nas fezes) e se fosse hospitalizada por diarreia.

3.5. Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo crianças cujos pais não aceitaram assinar o termo de consentimento informado, crianças com duração da diarreia superior a 2 semanas e crianças cuja diarreia teve início durante o internamento na unidade sanitária, isto é, a causa principal do seu internamento não fosse a GEA.

3.6. Tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$n = \frac{Z^2 P(1-P)}{d^2} \quad 27$$

Equação nº 1:

Onde:

Z – valor crítico correspondente ao grau de confiança

P-prevalência esperada da ocorrência de enterovírus

d- margem de erro permitido

✓ $Z = 1.96$

✓ $P = 15\% (0.15)$

✓ $1-p (q) = 1-0.15$

✓ $d = 5\% (0.05)$ ✓ $IC = 95\%$

O tamanho mínimo de amostra calculado foi de **196** amostras. Este cálculo foi feito com base na fórmula do cálculo do tamanho amostral apresentada na equação acima, assumindo um intervalo de confiança de 95% e uma prevalência esperada de 15%.

3.7. Análise Estatística

Durante o período de colheita das amostras os dados foram armazenados numa planilha do *Microsoft Excel*; Estes dados foram analisados com ajuda do pacote estatístico SPSS, versão 23.

Foi usado o teste qui-quadrado para a comparação das frequências entre as variáveis e o teste exacto de fisher para o caso em que o n fosse menor que 5. Foi considerado um intervalo de confiança de 95% e um nível de significância de 0,05.

3.8. Amostras clínicas

Neste estudo foram colhidas 227 amostras de crianças de idades compreendidas dos 0 aos 168 meses de idade. Estes participantes foram recrutados nas pediatrias dos

hospitais Geral de Mavalane e Geral José Macamo na cidade de Maputo. O recrutamento e colheita destas amostras decorreu de Maio de 2014 a Dezembro de 2015.

As amostras foram colhidas pelo representante legal das fraldas ou sobre um plástico e de seguida transferidas para o frasco fornecido no âmbito do estudo. As amostras foram conservadas em caixas térmicas refrigeradas e com gelo reciclável até a hora da recolha para o laboratório.

3.9. Colheita, Transporte e conservação das amostras

Foram colhidas amostras de fezes em frascos plásticos de 15 ml, conservadas e transportadas em caixas térmicas refrigeradas e com gelo reciclável até ao Laboratório de Parasitologia do Instituto Nacional de Saúde em Maputo, onde foram aliquotadas em criotubos de 2ml e conservadas a -80°C . De seguida as amostras foram transportadas em caixas térmicas refrigeradas e com gelo reciclável até ao Laboratório de Isolamento Viral e conservadas a -80°C até o momento do processamento.

Fluxograma de recolha e testagem das amostras

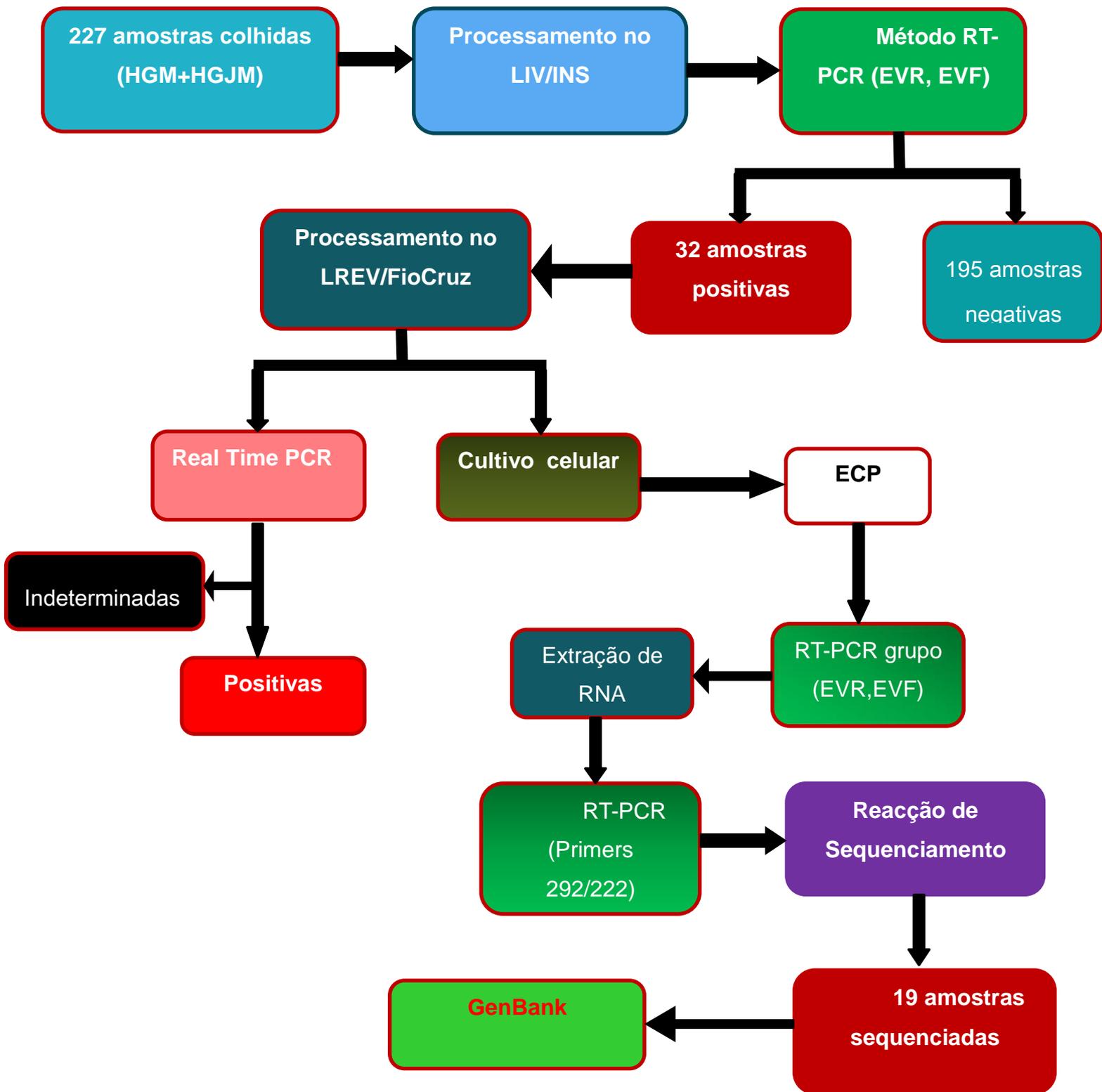


Figura 3 Fluxograma de recolha e testagem das amostras

As amostras positivas a RT-PCR foram aliquotadas em criotubos de 2ml, embaladas em gelo seco e enviadas ao Laboratório de Referência de Enterovirus na FioCruz (Rio de Janeiro) para confirmação da identidade do agente etiológico.

3.10. Processamento das amostras

3.10.1. Etapa1: Preparação de suspensões fecais

A preparação das suspensões foi feita de acordo com o protocolo para Rede de Laboratório para o diagnóstico da Poliomielite da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004), com algumas modificações e seguiu os seguintes passos:

- Em um microtubo de 2ml foram colocados 1 grama da amostra fecal, 1ml de água destilada, 100µl de antibióticos (contendo penicilina 10000 unidades/ml e estreptomicina 10000µg/ml) e 100µl de clorofórmio. Homogenizou-se em vortex por 5 minutos e em seguida centrifugou-se a 13200 rpm durante 5 minutos (a centrifugação foi repetida 3 vezes). Com auxílio de uma pipeta de Pasteur transferiu-se cerca de 1ml do sobrenadante para um microtubo de 2ml e armazenou-se a 70°C até ao momento da extracção do RNA viral.

3.10.2. Etapa 2: Extracção de RNA

A extracção do material genético foi realizada usando o kit viral RNA/DNA da invitrogen, segundo as orientações do fabricante (procedimento descrito no ponto 3.8.7)

3.10.3. Etapa 3: Transcriptase Reversa- Reacção em cadeia da Polimerase (RT-PCR)

Neste estudo foram usados para amplificação genómica os seguintes iniciadores: EVF = 5'-CTC CGG CCCCTG AAT GCG GCT A-3' e EVR= 5'-ATT GTC ACCATA AGC AGC C-3' produzindo um fragmento de 153 pares de bases da 5'NC, conservada em todos os genomas de enterovirus humanos conhecidos (Dos Santos et al., 2012).

- Num microtubo de 0.2 ml, aliquotou-se 30 µl da mistura composta por: 2 µl de água destilada, 1µl de SSIII/TlatinumTaqMix, 25µl de 2X Reaction Mix, 1µl de EV Forward primer [5pmol/µl] e 1µl de EV Reverse primer [5pmol/µl] e adicionou-se 20 µl do ARN extraído. Em seguida, a mistura foi submetida a um primeiro ciclo de 30 minutos a 55°C e 2 minutos a 94 ° C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 s a 55 °C e 1 minuto a 72 °C, e uma extensão final de 7 minutos a 72 °C, em termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems). O produto de PCR foi conservado a 2°C a 8°C até o momento da corrida do gel de agarose.

3.10.4. Visualização dos produtos amplificados em gel de agarose

Nesta etapa foram visualizados os produtos amplificados na etapa anterior; este processo seguiu as seguintes fases:

Preparou-se o gel de agarose a 1% seguida de aplicação do produto que consistiu em:

Misturar 2µL do corante 6X e 25µL da amostra (ou 2µL do corante 6X , 4µL marcador de 100 pb + 6µL de água destilada, no caso dos marcadores de peso molecular).A corrida da eletroforese foi realizada a 90V por 80 minutos. Os produtos amplificados com cerca de 153pb foram visualizados em um transiluminador (luz UV).

3.10.5. Envio de amostras

As amostras positivas a pesquisa de enterovírus por RT-PCR foram acondicionadas (amostras brutas) em gelo seco e enviadas ao Laboratório de referência de Enterovírus da Fiocruz (LEV), onde foram realizados os restantes testes para a confirmação do diagnóstico e apurar a identidade viral.

3.10.6. Preparação das suspensões fecais

Foram preparadas segundo o preconizado pelo manual da OMS (2004), recolheu-se o sobrenadante e alicotou-se cerca de 1,5 ml em tubo eppendorf de 2ml, e cerca de 4 ml num tubo plástico de 5 ml. Os tubos foram previamente rotulados com o devido número da amostra. As suspensões fecais foram armazenadas a temperatura de 20°C, até o momento do uso.

3.10.7. Extração de RNA

A extração do material genético foi realizado usando o kit viral RNA/DNA da invitrogen, segundo as orientações do fabricante. O RNA extraído foi armazenado a -80°C até o momento de uso.

-Num tubo eppendorf de 1,5ml colocaram-se 200µl da amostra, adicionaram-se 25µl da proteinase K e 200µl de buffer de lise com carreador. Incubou-se em termobloco a 56°C durante 15 minutos. Retirou-se e centrifugou-se por 20 segundos. Adicionou-se 250µl de etanol (96-100%) e incubou-se por 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se por 20 segundos e transferiu-se 675µl (esse é o volume total) para a coluna acoplada a um tubo colector. Centrifugou-se por 1 minuto a 8000rpm. Transferiu-se a coluna para um novo tubo colector, adicionou-se 500µl de Wash buffer e centrifugou-se por 1 minuto a 8000rpm. Repetiu-se o passo anterior e de novo transferiu-se a coluna para um novo tubo colector e centrifugou-se por 1 minuto a 8000rpm. Transferiu-se a coluna para um tubo eppendorf, adicionou-se 50µl de Rnase free water e incubou-se por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugou-se a velocidade máxima de 1400rpm por 1 minuto. O RNA foi armazenado a -80°C.

3.10.8. PCR em Tempo Real

32 amostras fecais, as quais foram positivas a RT-PCR foram investigadas quanto à presença do genoma RNA dos enterovírus. A pesquisa do genoma foi realizada pela PCR em tempo real One-Step (Machado et al, 2016) utilizando a TaqMan® como marcador de fluorescência. Inicialmente, preparamos as misturas de PCR para

amplificação da região 5' não codificante do genoma do grupo de enterovirus, utilizando os pares de oligonucleotídeos iniciadores directos e reversos, descritos abaixo na tabela abaixo:

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR em tempo real One-Step para pesquisa do genoma do grupo de enterovirus

Primer F	5'- GGCCCCTGAATGCGGCTA -3'	5' não codificante
Primer R	5'- AGGAAACACGGACACCCAAA -3'	5' não codificante
Sonda	5' -/56-FAM/ AAGTCYGTG/ZEN/GCGGAACCGACTA/3IABkGQ/-3'	

A técnica de PCR em tempo real *One-Step* foi realizada através da utilização de um kit Ag Path-ID one-step RT-PCR (Ambion). Em uma cabine de trabalho (DNA Workstation®, LOCCUS Biotecnologia), foi preparada a mistura da reação em um volume final de 25 µL. A primeira etapa consistiu no preparo da mistura única adicionando-se 1 µL de RT PCR *enzyme mix 25x*, 12,5µL de Tampão 2x para RT PCR, 9 µL da amostra, e por fim, 2,5µL da mistura dos oligonucleotídeos iniciadores com a sonda (tabela 4). A mistura contendo os iniciadores com a sonda é um produto pré fabricado denominado *PrimeTime®Std q PCR Assay* (Invitrogen).

Tabela 4: Preparação da mistura para a reação de PCR em tempo real One-Step para a busca do genoma dos enterovirus.

Reagentes	Concentrações de uso	Volume/Reação [µl]
RT PCR Tampão2x	0,25 pmol	12,5
<i>PrimeTime®Std q PCR Assay</i>	0,25 pmol	2,5
RT PCR <i>enzyme mix 25x</i>	25x	1
Volume da amostra (RNA)		9

A reação foi processada em equipamento 7500 Real Time PCR System®, Applied Biosystems, em ciclos descritos abaixo na tabela 5.

Tabela 5: Ciclos descritos pelo fabricante para a realização da técnica de PCR em tempo real One-Step.

	Número de Ciclos	Programa
<i>"Hot-Start Activation"</i>	1	95°C por 2 minutos
Desnaturação	40	95°C por 15 segundos
Anelamento/ Extensão		60°C por 60 segundos
Dissociação	1	60-95°C

3.11. Isolamento Viral

3.11.1. Inoculação em culturas celulares

Primeiramente, foram seleccionadas 3 linhagens celulares que permitem a replicação de enterovírus, nomeadamente: - Célula de linhagem continua proveniente de rabdomyosarcoma humano (RD); - Célula diplóide humana (MRC-5); e, - Célula de carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp2C). esta escolha foi feita segundo o Manual de Diagnóstico da Rede de Laboratórios de Referência para Poliomielite da Organização Mundial de Saúde - OMS (WHO, 2004).

Foi inoculado um volume de 0,2 ml da suspensão fecal em tubos contendo 1,8 ml de uma suspensão contendo 11×10^4 células/ml RD; A mesma quantidade foi inoculada em tubos contendo 1,8ml de suspensão contendo 11×10^4 células/ ml HEp2C e em placas contendo a mesma quantidade de células MRC-5.

Os tubos foram incubados a 37 °C na estufa, e foram realizadas leituras diárias com o auxílio de um microscópio invertido, por sete dias consecutivos em todas as linhagens celulares, para observação de um possível efeito citopático. Em seguida, as amostras foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento rápido, em gelo seco e álcool, seguido por aquecimento a 37°C, visando à liberação das partículas virais para uma segunda passagem em cultura celular.

Uma 2ª inoculação (2ª passagem) foi feita usando como inóculo a suspensão celular anterior e com as mesmas quantidades e de novo foram realizadas leituras diárias com o auxílio de um microscópio invertido, por sete dias consecutivos em todas as linhagens celulares para observação de um possível efeito citopático.

Os tubos com as amostras onde foi observada a existência de efeito citopático característico de enterovírus foram armazenados a temperaturas de -20°C para posterior confirmação por RT-PCR. O efeito citopático característico foi identificado pela mudança de metabolismo celular, alteração das características morfológicas, onde as células tornam-se arredondadas, enrugadas, apresentam picnose nuclear, degeneração e separação da superfície do tubo. Para cada grupo de amostras inoculadas, foi utilizado um controle celular, que era constituído apenas de células e meio mínimo essencial.

3.11.2. Detecção de enterovírus a partir dos isolados em linhagens de cultura celular

3.11.2.1. RT-PCR de Grupo PANEV para detecção de membros do gênero *Enterovirus*

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), foi necessária uma etapa de transcrição reversa uma vez que o material genômico destes vírus é o RNA. A reação de PCR é baseada na amplificação do molde do cDNA, por ciclos repetidos que compreendem três etapas diferentes.

Etapa1: Adicionou-se 1µl de primer Random (50pmol/ml) em 9 µl de RNA. Foram incluídos 1 control positivo e 1 control negativo. Esta mistura foi submetida a um ciclo de 65°C por 10 minutos em termociclador Thermal cycler 2720 (Applied Biosystem). Nesta etapa ocorre uma desnaturação do RNA.

Etapa2: Uma mistura constituída por 4µl de tampão 5X (5x first strand cDNA buffer); 2 µl de DDT(0,1M); 1,5µl de dNTPs(10 mM); 0,5µl de inibidor de Ribonuclease (40U/µ); e, 1µl de H₂O foi adicionada ao produto da etapa anterior. Esta mistura foi submetida a um ciclo de 42°C por 2 minutos. Nesta etapa ocorre a ligação dos oligonucleotídeos às fitas opostas do RNA molde.

Etapa 3: Ao produto da etapa 2, foi adicionado 1µl da enzima superscript II(20U/µl) e submetido a um ciclo de 42°C por 50 minutos. Nesta etapa ocorre a extensão do cDNA, sintetizado a partir do oligonucleotídeo ligado ao RNA molde.

3.11.2.2. *Transcriptase Reversa - Reacção em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)*

Foi usado um par de iniciadores denominados EVR (reverso) e EVF (senso) nas reações de RT-PCR da região terminal 5'NC do RNA, para a identificação de membros do gênero Enterovirus. Para esta região o tamanho do fragmento amplificado foi de 153 pb (Dos Santos et al, 2012).

Para esta reacção, foi aliquoteado 1 µl da suspensão celular contendo o vírus de cada amostra em tubos de 0,2 ml cada um devidamente identificados com o número da

respectiva amostra. A seguir centrifugou-se brevemente por 30 segundos a 13400 rpm e colocaram-se os tubos contendo as amostras no termobloco à 95°C por 3 minutos. Depois disso retiraram-se as amostras e colocaram-se no congelador a 20°C por 3 minutos para o choque térmico.

Após a inativação, foram acrescentados 2,5 µl de tampão 10X para PCR e 0,7 µl do iniciador R a 50 pmoles/ µl em cada tubo e foram submetidos a um ciclo de 95°C por 5 minutos para a desnaturação do RNA seguida de hibridização do iniciador R.

Retirou-se as amostras e colocaram-se em uma estação fria.

Em seguida, foram adicionados em cada tubo: 0,7 µl do iniciador F a 50 pmoles/ µl; 0,5 µl de dNTP's 10 mM (Invitrogen); 0,15 µl de RNase out a 5U/ µl (Recombinant Ribonuclease inhibitor, Invitrogen); 0,2 µl de Taq DNA polymerase a 5U/µl (Fermentas); 0,2µl da Transcriptase reversa a 20U/µl (SuperScript II reverse Transcriptase, Invitrogen), e 17µl de água deionizada autoclavada. A reação de RTPCR foi realizada com uma etapa de transcrição reversa de 42°C por 30 minutos, seguida por 30 ciclos de 45 segundos a 95°C para a desnaturação, 45 segundos a 55°C para o anelamento do iniciador e 45 segundos a 72°C para a extensão, em termociclador Thermal cycler (Applied Biosystems).

3.11.2.3. Avaliação dos produtos de RT-PCR da Região 5'NC por eletroforese em gel de acrilamida

Preparação do gel de acrilamida-Bisacrilamida

Num becker pipetou-se: -21,7ml de acrilamida-bisacrilamida(29:1)

-820 µl de TBE 10X

-4,7 ml de H₂O tridestilada

-40 µl de persulfato de amônio a 10%

-15 µl de TEMED

Pipetou-se esta mistura para o suporte da preparação do gel, colocou-se o pente e deixou-se polimerizar.

Preparação das amostras

- misturou-se 2 µl de corante 6X (gel loading buffer) a 11 µl do produto da PCR Esta mistura foi aplicada nos poços do gel. Foi usado um marcador de 50pb.

A corrida eletroforética foi realizada a 90V por 90 minutos em tampão TBE 0,5X e, em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (a uma concentração de 1,0 µg/mL) por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram visualizados em um transiluminador (luz UV, modelo UNIVERSAL Hood II- BIORAD).

3.12. Identificação molecular dos enterovírus isolados

3.12.1. Extração de RNA

Foi feita a extração de RNA das amostras positivas para o gênero Enterovirus por RT-PCR PAN-EV a partir das respectivas suspensões celulares, usando o Kit da Invitrogen segundo as instruções do fabricante (procedimento descrito no ponto 3.8.7).

3.12.2. Síntese do DNA complementar (c-DNA)

A síntese do cDNA consiste em 3 fases diferentes:

Etapa1: Adicionou-se 1µl de primer Random (50pmol/ml) em 9 µl de RNA. Foram incluídos 1 control positivo e 1 control negativo. Esta mistura foi submetida a um ciclo de 65°C por 10 minutos em termociclador Gene Amp PCR System 9700.

Etapa2: Uma mistura constituída por 4µl de tampão 5X (%x first strand cDNA buffer); 2 µl de DDT(Di-Thio-Treitol à 0,1M); 1,5µl de dNTPs(10 mM); 0,5µl de inibidor de Ribonuclease (40U/µl); e, 1µl de H₂O foi adicionada ao produto da etapa anterior. Esta mistura foi submetida a um ciclo de 42°C por 2 minutos. Nesta etapa ocorre a ligação dos oligonucleotídeos às fitas opostas do RNA molde

Etapa 3: Ao produto da etapa 2, foi adicionado 1µl da enzima superscript II(20U/µl) e submetido a um ciclo de 42°C por 50 minutos. Nesta etapa ocorre a extensão da nova cadeia de RNA, sintetizada a partir do oligonucleotídeo ligado ao RNA molde.

O produto de cDNA foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.12.3. Reacção em Cadeia da Polimerase para enterovírus não-pólio

Em um tubo de 0,2 mL, misturar: 25 µl enzima Go Taq® Green Master Mix 2X(Taq DNA polimerase 1,25 U; 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM de MgCl₂; Promega); 1,0 µl do iniciador 222 à 50 pmoles/ µL e 1,0 µL do iniciador 292 à 50 pmoles/ µl, e 20 µl de água deionizada autoclavada. A esta mistura adicionou-se 3 µl de c-DNA. Esta mistura foi submetida a 35 ciclos, sendo 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 42°C e 30 segundos a 60°C, e a uma extensão final de 7 minutos a 72°C em termociclador Veriti TM 96-well Thermal Cycler “Applied Biosystems”. Estes iniciadores amplificam o gene da proteína VP1 dos enterovírus, produzindo um fragmento de 357 pb. (Oberste et al. 2000).

3.12.4. Avaliação do produto da PCR em gel de agarose

Foi pesada 1gr de agarose e dissolvida em 100 ml de TAE 1X e homogenizada em microondas por 90 segundos. Deixou-se arrefecer um pouco e foram adicionados 8µL de brometo de etídio, misturou-se e a mistura foi colocada no suporte e deixou-se repousar por 30 minutos para solidificar.

Foram aplicados 10µL do marcador molecular no primeiro poço do gel e nos restantes foram aplicadas as amostras incluindo os controis. A corrida electroforética foi realizada a 100 volts por aproximadamente 1 hora em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. Os produtos amplificados foram visualizados em um transiluminador (luz UV).

3.13. Purificação dos produtos da PCR

As bandas foram cuidadosamente cortadas e retiradas do gel de agarose e aliqüotadas em tubos eppendorfs de 1,5 a 2ml devidamente identificados com o

respectivo número da amostra. A purificação foi feita usando o kit de Qiagen segundo as instruções do fabricante.

3.13.1. Reacção de sequenciamento- cycle sequencing

Em tubos de 0,2ml devidamente identificados foram aliqotados 1µl do primer reverso (222) a 5 pmoles/ µL; 4,0 µL do Big Dye®Terminator; 1,5µl do tampão BD;10µl da amostra e 3,5µl de H₂O para as amostras. Para o control usou-se o 2µl do PGN(+); 4µl de primer M13; 4,0 µl do Big Dye®Terminator; 1,5µl do tampão BD e 8,5µl de H₂O, perfazendo um volume final de 20µl. Homogenizar e centrifugar brevemente. Esta mistura foi submetida a 25 ciclos de: 96°C a 25s; 42°C a 30s; 60°C por 3 min e por fim 8°C - ∞.

3.13.2. Precipitação do DNA por isopropanol

Cada produto do sequenciamento foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5ml. Adicionaram-se em cada tubo 80 µl de isopropanol a 75%. Agitaram-se brevemente os tubos com auxilio de vórtex. Deixou-se repousar por 20 minutos a temperatura ambiente no escuro. Findo este periodo, centrifugou-se a uma velocidade de 13000rpm por 20 minutos. Aspirou-se cuidadosamente o sobrenadante e descartouse. Adicionou-se 250 µl de isopropanol a 75%, agitou-se brevemente com auxilio do vórtex e centrifugou-se a velocidade de 13000rpm por 5 minutos. Aspirou-se o sobrenadante e descartou-se. A seguir secaram-se as amostras no speed-vac por aproximadamente 15 minutos.

Estas amostras foram conservadas no congelador a -20°C no escuro até o seu envio para a plataforma de sequenciamento.

4. RESULTADOS

4.1. Características sócio-demográficas dos participantes

Foram incluídos neste estudo 227 pacientes que apresentavam quadro de gastroenterite aguda, cujas características sócio-demográficas são ilustradas na tabela 6. Amostras de fezes foram colhidas no hospital geral de Mavalane 151 (66,5%) e no Hospital Geral José Macamo 76 (33,5%). Os meses de Julho e Agosto de 2015 registaram o maior número de amostras colhidas (35 e 44 respectivamente), porém, no mês de Dezembro de 2014 não se obteve amostras.

A mediana das idades dos participantes foi de 12 meses com o intervalo interquartil de 8 a 17, sendo que a maioria dos participantes do estudo foi do sexo masculino com o total de 132 (58,1%) e a faixa etária com mais casos de diarreia foi dos 13 aos 24 meses com 97 (42,7%) participantes, seguida da faixa dos zero aos 12 meses com 96 (42,3%), dos 25 aos 60 meses com 19 (8,4%) participantes e 3 (1,3%) dos participantes não foi possível saber a idade. A maior parte dos participantes, 212 (93,4%) faziam alimentação diversificada e 206 (90,7%) dos participantes estavam sobre os cuidados dos pais.

4.2. Características sóciodemográficas das crianças com diarreia aguda e positivas a enterovírus não pólio

Das 227 incluídas, 32 (14%) foram positivas a pesquisa de enterovirus não pólio (EVNP). Das 32 crianças positivas, 22 (68,8%) eram do sexo masculino e 10 (31,2%) do sexo feminino. Em relação a idade, 9 (28,1%) eram da faixa etária dos zero aos 12 meses, 18 (56,2) dos 13 aos 24 meses, 2 (6,3%) dos 25 aos 60 meses e 3 (9,4%) maiores de 60 meses.

Das 32 crianças positivas, 26 (81,3%) recebiam alimentação diversificada, 4 (12,5%) faziam só o leite materno e 2 (6,2%) faziam o leite artificial. Quanto ao cuidador principal, 28 (87,5%) estavam sobre os cuidados da mãe ou do pai, 3 (9,4%) eram cuidados pelos avôs e 1(3,1%) era cuidado pela vizinha. De referir também que

20 (62,5%) destas crianças bebiam água não tratada e 18 (56,3%) vinham de famílias que usavam latrina, 10 (31,3%) usavam casa de banho melhorada fora de casa, 2 (6,2%) usavam casa de banho dentro de casa e 2 (6,2) não tinham informação (vide tabela 6).

Tabela 6: Características sócio-demográficas e comparação entre os negativos e positivos à pesquisa de EVNP por RT-PCR dos participantes do estudo.

Características	Total	Resultado de EVNP (por RT-PCR) (N=227)		Pvalue
		Negativo N=195 (86%)	Positivo N=32 (14%)	
Sexo				
Masculino	151 (66,5)	111(56,9)	22 (68,7)	0,248
Feminino	76 (33,5)	84 (43,1)	10 (31,3)	
Faixa etária (meses)				
0 – 12	96 (42,3)	87(44,6)	9 (28,1)	0,170
13 – 24	97 (42,7)	79 (40,5)	18 (56,2)	
25 – 60	19 (8,4)	17 (8,7)	2 (6,3)	
> 60	12 (5,3)	9 (4,6)	3 (9,4)	
SI	3 (1,3)	3 (100)	0 (0,0)	
Tipo de alimentação				
Leite Materno	7 (3,1)	5 (2,6)	2 (6,3)	0,324
Leite Artificial	8 (3,5)	7 (3,6)	1 (3,1)	
Alimentação diversificada	212 (93,4)	183 (93,8)	29 (90,6)	
Cuidador principal da criança				
Mãe/Pai	206 (90,7)	178 (91,3)	28 (87,5)	0,374
Irmãos, Tios, Avôs	18 (7,9)	15 (7,7)	3 (9,4)	
Outros	3 (1,3)	2 (1,0)	1 (3,1)	
Tratamento de água				
Água tratada	79 (34,8)	67 (34,9)	12 (37,5)	0,842
Água não tratada	145 (63,9)	125 (65,1)	20 (62,5)	
SI	3 (1,3)	3 (100)	0 (0,0)	
Tipo de sanitário				
Dentro de casa	21 (9,2)	19 (9,7)	2 (6,7)	0,130
Melhorado fora de casa	99 (43,6)	89 (45,6)	10 (33,3)	
Latrina	103 (45,4)	85 (43,6)	18 (60,0)	
SI	4 (1,8)	4 (2,1)	0 (0,0)	
Nr de agregado familiar				
<5 pessoas	109 (48,0)	92 (47,2)	17 (53,1)	0,748
5 – 10	91 (40,1)	80 (41,0)	11 (34,4)	
11 -15	21 (9,3)	17 (8,7)	4 (12,5)	
≥16	1 (0,4)	1 (0,5)	0 (0,0)	
SI	5 (2,2)	5 (2,6)	0 (0,0)	
Nr de crianças na casa				
< 3	164 (72,3)	139 (71,3)	25 (78,1)	0,936
4 – 6	50 (22,0)	44 (22,6)	6 (18,8)	
7 – 10	8 (3,5)	7 (3,6)	1 (3,1)	
≥11	5 (2,2)	5 (2,5)	0 (0,0)	

A figura 4 ilustra algumas das amostras testadas e visualizadas em gel de agarose a 1%.

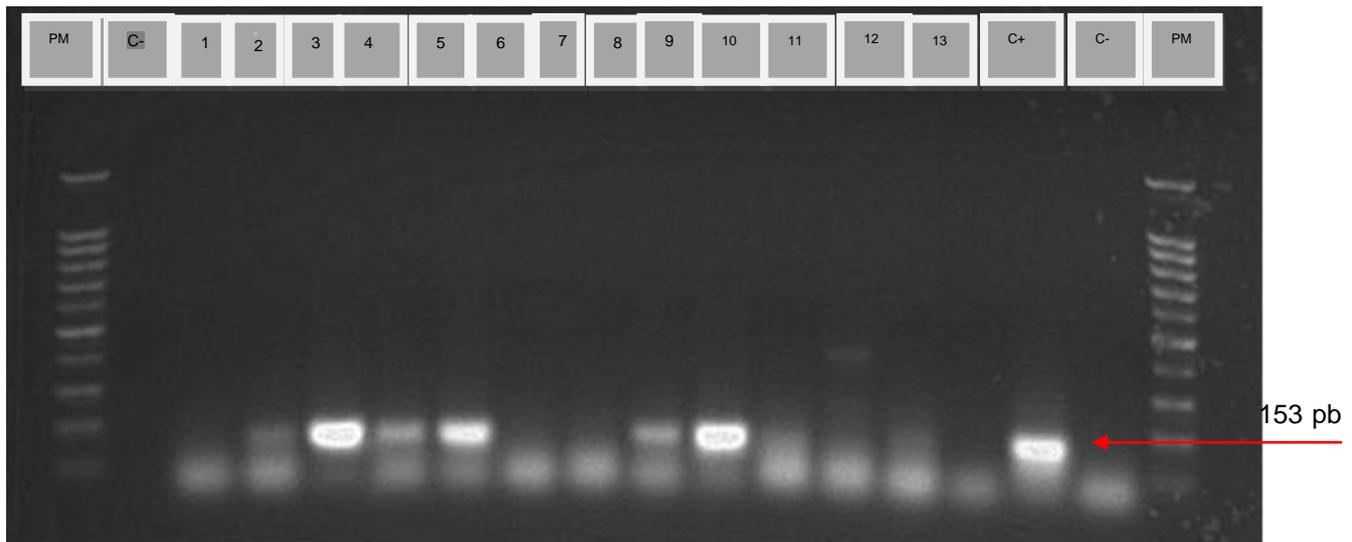


Figura 4 Visualização das bandas em gel de agarose 1%. O fragmento amplificado foi de 153pb Onde: PM- Peso molecular; C- -controle negativo; C+- controle positivo; 1-13- amostras testadas

Observou-se que a maior parte dos participantes 56,9% (111/227) foi do sexo masculino. A taxa de detecção dos EVNP, foi maior também neste grupo 68,7% (22/32). Em relação a faixa etária, a taxa de detecção de EVNP foi heterogênea, tendo se observado maior detecção na faixa dos 12 aos 24 meses (figura 5).

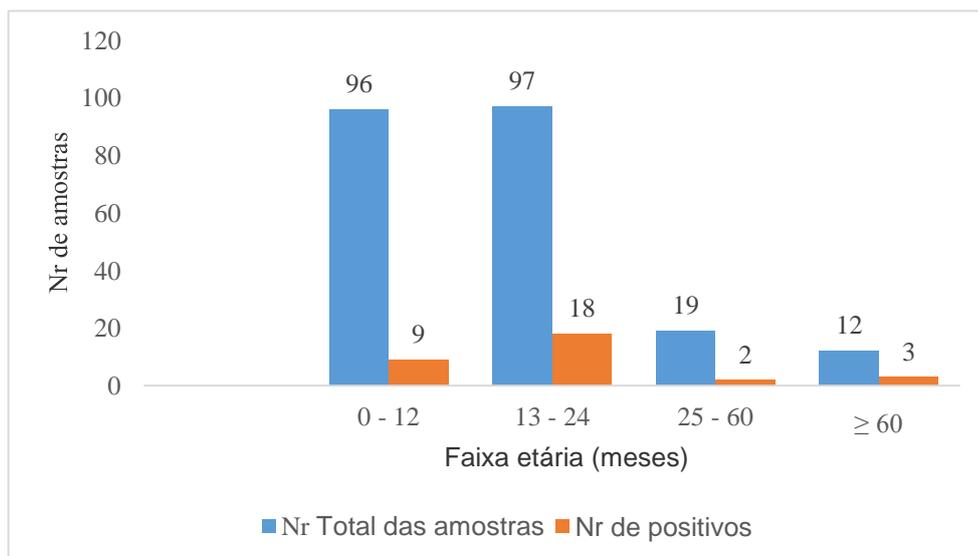


Figura 5: Frequência de detecção de EVNP por faixa etária. A taxa de detecção foi maior na faixa dos 12 aos 24 meses 18/32 (56,2%), seguida da faixa dos 0 aos 12 meses com 9/32 (28,1%), a faixa dos maiores de 60 meses com 3/32 (9,4%) e por fim a faixa dos 25 aos 60 meses com 2/32 (6,3%).

Em relação ao tipo de alimentação, a maior taxa de detecção observou-se nas crianças que tinham uma alimentação diversificada 29/32 (90,6%), seguido das que se alimentavam só do leite materno 2/32 (6,3%) e por fim as que se alimentavam de leite artificial 1/32 (3,1%). Uma taxa maior de detecção se verificou nas crianças que estavam sob o cuidado dos pais 28/32 (87,5%), seguido das que eram cuidados por outros parentes (irmãos, tios ou avôs) 3/32 (9,4%) e as que eram cuidadas por outras pessoas (vizinha, babá) 1/32 (3,1%) (vide tabela 7).

Observando as condições higienicas, observou-se que maior número de crianças vinha de famílias que usavam latrina (103) e foi neste grupo que se observaram mais casos positivos a pesquisa de EVNP (18), seguida pelas crianças que vinham de famílias que usavam sanitário fora de casa (99) com 10 casos positivos e por fim 21 com sanitário dentro de casa com 2 positivos. Observou-se também que maior número de casos positivos (17) registou-se em crianças que vinham de agregados de menos de 5 pessoas (109) seguido das que vinham de agregados de 5 a 10 pessoas (91) com 11 casos positivos (tabela 7).

4.3. Características clínicas das crianças positivas ao enterovírus não pólio

Analisando a sintomalogia clínica das crianças positivas, verificou-se que 59,4% (19/32) apresentava vômitos, 53,1% (17/32) tinha avidez pela água, 37,5% (12/32) apresentava olhos encovados, 15,6% (5/32) apresentava prega cutânea e 37,5% (12/32) apresentava um quadro febril. Destes pacientes, 12,5% (4/32) era HIV positivos (vide tabela 8).

Tabela 7: Principais sintomas clínicos reportados pela população de estudo.

Características clínicas	Total (N=227)	Resultado de Enterovírus (RT-PCR)		Pvalue
		Negativo, 195 (86,0%)	Positivo 32 (14,0%)	
Vômitos				
Sim	136 (59,8)	117 (60,0)	19 (59,4)	1,000
Não	88 (38,8)	76 (39,0)	12 (37,5)	
SI	3 (1,3)	2 (1,0)	1 (3,1)	
Letargia				
Sim	32 (14,1)	29 (14,9)	3 (9,4)	
Não	189 (83,3)	160 (82,0)	29 (90,6)	
SI	6 (2,6)	6 (3,1)		
Agitação				
Sim	22 (9,7)	20 (10,3)	2 (6,3)	0,747
Não	196 (86,3)	167 (85,6)	29 (90,6)	
SI	9 (4,0)	8 (4,1)	1 (3,1)	
Avidez pela água				
Sim	173 (76,2)	156 (80,0)	17 (53,1)	0,002
Não	47 (20,7)	33 (16,9)	14 (43,8)	
SI	7 (3,1)	6 (3,1)	1 (3,1)	
Olhos encovados				
Sim	112 (49,3)	100 (51,3)	12 (37,5)	0,159
Não	110 (48,5)	91 (46,7)	19 (59,4)	
SI	5 (2,2)	4 (2,0)	1 (3,1)	
Prega cutânea				
Sim	50 (22,0)	45 (23,1)	5 (15,6)	0,459
Não	169 (74,5)	142 (72,8)	27 (84,4)	
SI	8 (3,5)	8 (4,1)	0 (0,0)	
Criança febril				
Sim	75 (33,0)	63 (32,3)	12 (37,5)	0,403
Não	146 (64,3)	129 (66,2)	17 (58,6)	
SI	6 (2,6)	3 (1,5)	3 (3,9)	
Característica das fezes				
Líquidas	76 (33,5)	64 (32,8)	12 (37,5)	0,221
Pastosas	146 (64,3)	128 (65,6)	18 (56,2)	
SI	5 (2,2)	3 (1,5)	2 (6,3)	
Estado serológico da criança				
HIV Positivo	23 (10,1)	19 (9,7)	4 (12,5)	0,305
HIV Negativo	133 (58,6)	113 (58,0)	20 (62,5)	
Indeterminado	2 (0,9)	1 (0,5)	1 (3,1)	
Desconhecido	69 (30,4)	62 (31,8)	7 (21,9)	

4.4. Detecção de Enterovírus por Real time PCR

As amostras positivas a RT-PCR no Laboratório de Isolamento viral do INS, foram enviadas para o Laboratório de Enterovírus da FIOCRUZ, onde foram realizados os testes adicionais para a confirmação da identidade viral. Havendo necessidade de

se verificar a viabilidade das amostras, estas foram submetidas à pesquisa de enterovírus por PCR em Tempo Real usando o RNA extraído directamente da suspensão fecal e o resultado obtido foi de 29 (90,6%) positivas e 3 (9,4%) indeterminadas.

4.5. Isolamento viral através do cultivo celular

As amostras positivas a RT-PCR foram inoculadas nas seguintes linhagens celulares: MRC5, RD e Hep-2C, onde foram feitas 2 passagens em ambas linhagens e 100% (32/32) apresentaram efeito citopático na linhagem MRC5; 46,9% (15/32) em RD e 3,1% (1/32) em Hep-2C. Entretanto, nem todas as amostras que tiveram efeito citopático foram positivas ao RT-PCR de grupo (PANEV). As 3 amostras que tiveram resultado indeterminado no teste Real Time PCR, também mostraram efeito citopático nas células MRC5 mas, foram negativas a PCR de grupo. A figura 6 mostra a detecção de membros do gênero *Enterovirus*, visualizados em gel de bisacrilamida onde o fragmento amplificado é de 153 pb.



Figura 6 Visualização das bandas no gel de acrilamida. O fragmento amplificado foi de 153 pb, onde: PM= peso molecular e os números 1, 2, 5, 7, 8 e 9 representam as amostras positivas; 3, 4 e 6 amostras negativas; C- = controle negativo e C+ = controle positivo.

Todas as 32 amostras positivas a RT-PCR causaram efeito citopático na célula MRC5, mas somente 9 foram positivas a RT-PCR de grupo e destas, foi possível apurar a identidade viral através de sequenciamento parcial genômico em apenas

sete. Quanto a linhagem celular RD, 12 amostras causaram efeito citopático característico e todas foram possíveis de apurar a identidade viral. O vírus mais isolado foi Echovírus em menores de 24 meses (99%). O Coxsackievírus A20 foi o sorotipo isolado em criança com idade maior que 60 meses.

Tabela 8: Espécies, sorotipos de enterovirus não-pólio isolados e sintomologia clínica reportada em crianças com diarreia aguda

Espécie/ Sorotipos	Nr isolados	deLinhagem celular	Sexo		Sintomas	Faixa etária (meses)				
			F	M		0-12	13-24	25-60	≥60	
HEV-B (N=12)										
E-3	10	RD	5	5	vo, fb, bpn, t, oe, pc,bq, dn	5	4	1	-	
E-13	1	RD		1	fb, vo	-	1	-	-	
E-31	1	RD		1	dn, lg, anr,at	-	-	1		
HEV-C (N=7)										
CV – A13	3	MRC-5	1	2	vo,fb, bpn, dn	-	2	-	1	
CV-A20	1	MRC-5		1	dn, vo	1	-	-	-	
CV – A24	2	MRC-5, Hep2C	1	1	vo, ag, lg,rf	1	-	-	1	
EV – C99	1	MRC-5	1		dn, oe	-	1	-	-	

Legenda: dn= desnutrição; vo= vômitos; lg= letargia; ag= agitação; rf= resfriado comum; bq= bronquiolite; fb=febres;oe=olhos encovados; t=tosse; at=astenia; pc=prega cutânea ; anr= anorexia.

4.6. Sorotipos de Enterovírus Não-Pólio isolados

No total, foram isolados 19 sorotipos pertencentes ao HEV B e HEV C, sendo que a maior parte dos isolados pertence a espécie HEV-B. A proporção de isolamento foi de 53% (10/19) para o Echovírus 3; 16% (3/19) para o Coxsackievírus A13; 11% (2/19) para o Coxsackievirus A20 e Echovirus 13; Echovirus 31, Coxsackievírus A24, Enterovírus 99 com 5% (1/19) respectivamente (figura 6). As crianças das quais se isolou o HEV B 58,3% apresentavam vômitos, 58,3% estavam febris, 16,7% estavam anêmicas, 25% estavam desnutridas e 50% delas tinha problemas respiratórios.

85,7% (6/7) das crianças nas quais se isolou HEV C apresentavam vômitos; 28,6% (2/7) estavam com febres 14,3% (1/7) estava desnutrida e 42,8% (3/7) apresentavam problemas respiratórios.

Todos os echovírus foram isolados em crianças com idades compreendidas entre os 2 e os 28 meses. Estes pacientes apresentavam sintomas como BPN,

vômitos, anemia, febres, tosse, Broncospasma, olhos encovados, letargia, desnutrição e bronquiolite. O coxsackievírus A24 e o enterovírus C99 foram isolados em crianças dos 6 aos 22 meses.

As crianças das quais foi isolado o CV-A24 apresentavam como sintomas tosse, vômitos e avidez pela água. O enterovírus C99 foi isolado em criança em criança com 19 meses de idade e apresentava vômitos. Já o coxsackievírus A13 foi isolado em crianças um pouco mais velhas nomeadamente 9, 42 e 168 meses e que apresentavam como sintomas IVRS, pneumonia, constipação, vômitos e febres.

O Coxsackievírus A20 foi isolado em criança com 150 meses de idade e apresentava como sintomas a febre, vômitos, olhos encovados e uma desidratação moderada (vide tabela 8).

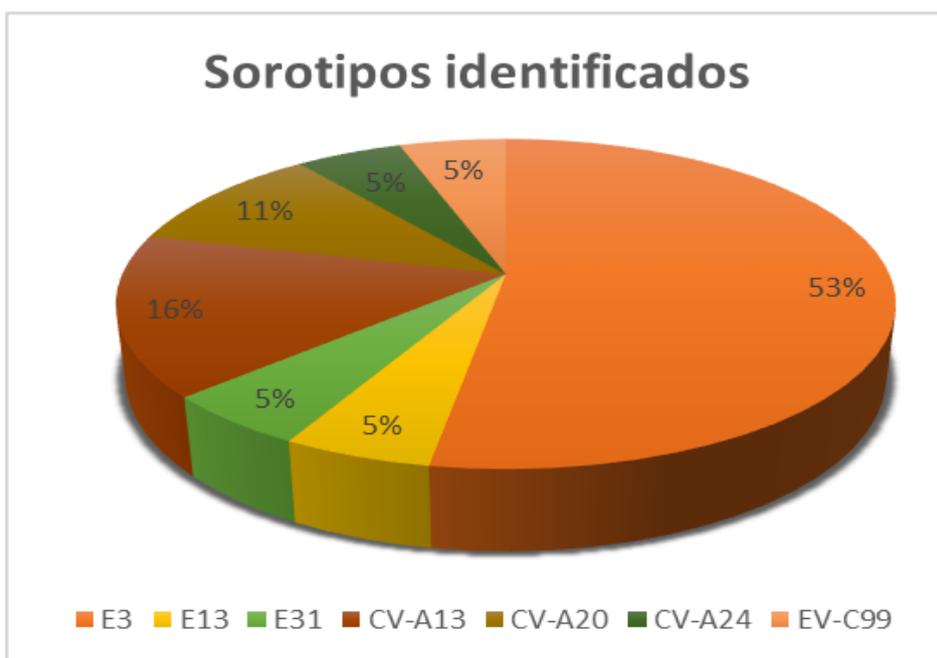


Figura 7: Sorotipos dos enterovirus não-polio identificados.

O Echo 3 foi o mais isolado em 10 amostras, o Cox A13 em 3.

5. DISCUSSÃO

A gastroenterite aguda é um problema de saúde pública no mundo inteiro (Harada et al, 2009). Doenças diarreicas são a causa de morbidade e mortalidade em crianças representando cerca de um bilhão de episódios de doença e 1.6 a 2.5 milhões de mortes anualmente (Rao et al, 2014). Embora a maioria dos EVNP têm sido reportados em alguns estudos de caso como estando associados a diarreia aguda, por falta de investigações mais detalhadas, estes ainda não foram reconhecidos como uma causa significativa da gastroenterite aguda (Rao et al, 2013; Rao et al, 2014). O presente estudo tinha como objectivo investigar a presença de enterovírus não pólio em amostras de crianças com diarreia aguda.

Os enterovírus não-pólio foram detectados em 14% das amostras por RT-PCR. Um estudo realizado em crianças com gastroenterite aguda por Rao et al (2013) na Índia, reportou uma frequência de 19% de EVNP. Por sua vez, Patil et al (2015) também na Índia, reportou uma frequência de 13,7% de EVNP num estudo de caso controle. Ambos estudos sugerem uma forte associação entre EVNP e a gastroenterite aguda. Contudo, alta prevalência já foi reportada por Mota et al, (2016) 26,1% de EVNP no norte do Brasil em crianças < 5 anos de idade com gastroenterite aguda.

Foi realizado teste confirmação quanto à presença do genoma RNA dos enterovírus através do método de PCR em tempo real, onde 90,6% (29/32) foram positivas e 1,3% (9,4%) foram indeterminadas. Este método tem sido reportado como sendo mais sensível do que o cultivo celular que é o padrão ouro para o diagnóstico dos enterovírus além de que nem todos enterovírus se replicam em culturas celulares como é o caso de certos vírus coxsackie do grupo A (Nijhuis et al, 2002; Machado et al, 2016).

A maior frequência de detecção de EVNP, foi observada em crianças dos 0 aos 24 meses de idade. Este resultado é similar aos resultados descritos em estudos anteriores (Rao et al, 2013; Patil et al, 2015; Mota et al, 2016). Segundo Pallansch & Roos, 2001, o pico das infecções se verifica nas crianças dos 0 aos 2 anos de idade. Existe uma diferença de susceptibilidade à infecção por enterovírus nos diferentes grupos etários, o que pode ser devido ao modo como as crianças brincam, tocando nos brinquedos, em objectos sujos, nas outras crianças, levando sempre as mãos e os dedos à boca (Cochran et al, 2016).

As crianças mais afectadas pelo EVNP neste estudo foram as do sexo masculino, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa. Outros estudos mostraram resultados similares (Bero et al. 2015; Patil et al, 2015;). Segundo Pallansch & Roos (2001), crianças do sexo masculino são mais predispostas á infecção por enterovirus pelo facto estarem mais expostas ao vírus devido a sua natureza mais activa e por terem um tempo de excreção viral mais prolongado.

A maior parte das crianças positivas recebia uma alimentação diversificada (90,6%), Bebia água não tratada (62,5%) e as famílias usavam como sanitário a latrina (60%). Apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa, consideramos que as crianças que tem uma alimentação diversificada são mais susceptíveis de contrair infecção por enterovirus, e isso está relacionado com a via de transmissão que é fecal-oral (Pallansch & Roos, 2001).

Usando latrinas de fossa rudimentar muitas vezes torna-se inevitável a contaminação do meio ambiente assim como a contaminação das mãos, dos alimentos e da água. A má qualidade de água, más condições de higiene e saneamento do meio permitem a transmissão de agentes patogénicos entéricos de individuos infectados para novos hospedeiros susceptíveis através de contacto directo e/ou através do ambiente (Brown et al, 2015)

No que diz respeito a sintomatologia apresentada pelas crianças com resultado positivo à pesquisa de EVNP, verificou-se que parte considerável delas apresentavam vômitos, avidez pela água, olhos encovados e febres; segundo Pallansch & Roos (2001) e Ketsuriane & Parashar (2009) uma infecção por enterovirus pode causar sintomas como febres altas, dores de cabeça, dores musculares, dificuldades respiratórias, dores abdominais, tosse, náuseas e vômitos.

As 32 amostras positivas a RT-PCR foram inoculadas em 3 linhas celulares: RD, HEp2C e MRC5. Estas linhas celulares tiveram desempenho diferente. Estudos anteriores também mostraram diferença de desempenho em diferentes tipos de células, pois, não existe uma linha única de células susceptível para todos os HEV e cada tipo de célula tem susceptibilidade diferente para cada tipo de virus além de que cada espécie de HEV tem características específicas na sua propagação em culturas celulares (Johnston & Siegel, 1990; Pallansch & Roos, 2001; Ruiz et al 2003; Lin et al 2007; Prim et al, 2013). Na linhagem celular RD foi possível isolar os Echovirus (HEV-B) e das células MRC-5 isolaram-se os Coxsackievirus e o Enterovirus C99 (HEV-C).

Este resultado contradiz os resultados obtidos por Ruiz et al (2003) e Prim et al (2013) onde as células MRC-5 foram mais susceptíveis ao isolamento de Echovírus. De um total de 32 amostras positivas a RT-PCR, só foi possível isolar e sequenciar pelo método de cultivo celular 19 amostras, isto pode ter as seguintes explicações: carga viral muito baixa ou então o tipo de enterovírus presente nas amostras não se replica em culturas celulares (Pallansch; & Roos, 2001; Nijhuis et al, 2002; Machado et al, 2016).

Das 19 amostras em que foi possível serotipar os enterovírus, os echovírus foram os mais detectados (63,0%); os Coxsackievírus (32,0%) e o Enterovírus C99 (5,0%). Estes serotipos já foram isolados em estudos similares em África e Ásia na caracterização molecular de agentes entéricos em crianças e em crianças com gastroenterite aguda (Silva et al 2008; Rao et al 2013; Rao et al, 2014; Patil et al 2015). Entretanto, estudos anteriores também mostraram que os vários sorotipos de EVNP isolados neste estudo podem estar associados a outras doenças.

O E31 já foi isolado em pacientes com infecções respiratórias agudas (Portes et al, 1998), Ketsuriani & Parashar (2009) também reportaram CV-A24 como um dos vírus associado a doenças respiratórias. O E3, E13, CV-A13, CV-A20, CV-A24 e EVC99 já foram reportados em outros estudos como estando associados a doenças como paralisia flácida aguda, meningite e Displasia acrômica (Apostol et al 2012; Bessaud et al, 2012; por Maan et al, 2013; Alves et al, 2014).

O CV-A20 e o EV-C99 também foram isolados num estudo realizado na Nigéria em crianças saudáveis (Faleye et al, 2016). Em Moçambique, num estudo realizado em menores de 15 anos com quadros compatíveis com a infecção por enterovírus, foram isolados alguns destes sorotipos nomeadamente E13 e CV-A20, sendo que o E13 foi isolado em criança com GEA (Bero et al, 2015).

6. PERSPECTIVAS/RECOMENDAÇÕES

6.1. Perspectivas

- Construir a árvore filogenética dos sorotipos isolados para incluir no artigo a ser publicado em breve.
- Publicação do artigo científico.
- Realizar um estudo de caso-controle para verificar a associação dos EVNP com a gastroenterite aguda. Para isso, aumentar o tamanho da amostra e testar também para outros patógenos causadores de diarreia.

6.2. Recomendações

- Implantar a rotina de diagnóstico de enterovírus não-pólio em casos de diarreia, no Sistema Nacional de Saúde, em Moçambique;
- Realizar um estudo epidemiológico dos EVNP em todo país;

7. CONCLUSÕES

- Este estudo reporta uma detecção de 14% de enterovírus não-pólio em crianças com diarreia aguda por RT-PCR e 12, 8% por RT-PCR em tempo real.
- O isolamento viral foi feito através da inoculação das amostras em células RD, Hep2C e MRC5. Foram isolados HEV-B (E3, 13, 31) através das células RD e através das células MRC-5 foram isolados os HEV-C (CV-A13, 20,24 e EV-C99).
- As crianças positivas a pesquisa de EVNP apresentavam sintomas como vômitos, avidez pela água, febres, olhos encovados, prega cutânea, letargia, agitação, desnutrição, tosse, anorexia, astenia, broncopneumonia, bronquiolite e resfriado comum.
- Ainda que os resultados sejam de difícil interpretação, devido à natureza dos agentes pesquisados, a presença de enterovírus em fezes de crianças com gastroenterite aguda sugere fortemente a participação dos enterovírus nestes quadros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abad FX, Pinto RM, Bosch A (1994). Survival of enteric viruses on environmental fomites, *Appl Environ Microbiol* 60:3704-3710.
2. Abad FX, Pinto RM, Bosch A (1997). Disinfection of human enteric viruses on fomites, *FEMS Microbiology Letters* pp. 107-111.
All Members of the Genus Enterovirus in Different Clinical Specimens by Real-
3. Altschul SF, GishW, Miller W, Myers EW, Lipmaan DJ (1990). Basic local alignment search tool . *Journal of Molecular Biology*. V.215, p. 403-410.
4. Alves CS, Wanzeller ALM, Silveira E, Alves AS, Primo EG, Oliveira DS, Linhares AC, De Castro C.M.O (2014). Isolamento e identificação molecular dos enterovírus não pólio em casos de paralisia flácida aguda, ocorridos na Região Norte do Brasil, no período de 1996 a 2006. *Rev Pan-Amaz Saúde*.
Antigenic structural of polioviruses of serotypes 1,2 and 3. *J Gen Virol* 67: 1283-1291.
5. Apostol LN, Suzuki A, Bautista A, Galang H, Paladin FM, Fuji N, Lupisan S, Olveda R, Oshitani H (2012). Detection of non-polio Enteroviruses from 17 years of Virological Surveillance of Acute Flaccid Paralysis in the Philippines. *Journal of Medical Virology* 84: 624-631.
Assis RM, Costa FAC, Oliveira SA, Leite JPG, Miagostovich MP (2012). Assessment of Gastroenteric Viruses Frequency in a Children's Day Care Center in Rio De Janeiro, Brazil: A Fifteen Year Study (1994-2008). *PLoS One* vol 7.
6. Bell EJ, McCartney RA, Basquill D, Chaudhuri AK (1986). Mu-antibody capture ELISA for rapid diagnosis of enterovirus infections in patients with aseptic meningitis. *J Med Virol* 19:213-217.
Bennet J & Dolin R (2010). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, Seventh ed., pp. 2337. Philadelphia: Elsevier.
7. Bero DM, de Deus N, da Costa EV, Burlandy FM, Jani IV, da Silva EE (2015). Natural circulation of human enterovirus in Maputo city, Mozambique. *African Journal of Microbiology Research*, pp. 1419-1423.
8. Bessaud M, Pillet S, Ibrahim W, Joffret M, Pozzetto B, Delpeyroux F, Gouandjika-Vasilache I, (2012). Molecular Characterization of Human

- Enteroviroses in the Central African Republic: Uncovering Wide Diversity and Identification of a New Human Enterovirus A71 Genogroup. *Journal of Clinical Microbiology* p. 1650-1658.
9. Bodian D, (1949). Histopathologic basis of the clinical findings in poliomyelitis, *Am J Med*, pp. 563-78.
 10. Brown J, Cumming O, Bartram J, Cairncross S, Ensink J, Holcomb D, Knee J, Kolsky P, Liang K, Liang S, Nala R, Norman G, Rheingans R, Stewart J, Zavale O, Zuin V, Schmidt W-P (2015). A controlled, before-and-after trial of an urban sanitation intervention to reduce enteric infections in children: research protocol for the Maputo Sanitation (MapSan) study, Mozambique. *BJM open*, 2015. 5(6): P. e008215.
 11. CESO CI Portugal (2011). Manual do empreendedor Moçambique. Disponível no endereço electrónico <http://www.opais.sapo.mz> (acesso: 18.00; 30/04/2017).
 12. Cochran WJ, (2016). Gastroenteritis in Children. The Merckmanuals. Disponível no endereço electrónico <http://www.merckmanuals.com/home/children-s-health-issues/digestivedisorders-in-children/gastroenteritis-in-children> (acesso:19.50; 31/01/2017).
 13. Cooney MK, Hall CE, Fox JP (1972). The Seattle virus watch. 3. Evaluation of isolation methods and summary of infections detected by virus isolations. *Am J Epidemiol* 96: 286-305.
 14. Corredor MB, Mas Lago PJ (2016). Microbiologia y Parasitología Médicas Tomoll. Cap 64 Picornavirus. Disponível no endereço electrónico <http://gsdl.bvs.sld.cu/cgi-bin/library>.
 15. Dhole TN, Ayyagari A, Chowdary R, Shakya AK, Shrivastav N, Datta T, Prakash V (2009). Non-polio enteroviruses in acute flaccid paralysis children of India: Vital assessment before polio eradication. *Journal of Paediatrics and Child Health* 45:409-413.
 16. Douglas JD, Soike KF, Raynor J (1970). The incidence of poliovirus in chimpanzees. *Lab Anim Care* 20:265-268.
 17. EasyExpat (2015). Geografia de Maputo. Disponível no endereço electrónico <http://www.easyexpat.com/pt/guides/mozambique/maputo/visaogeral/geografia.htm>.
- Enteric Viral Agent from Children in Northern Region of Ghana. *Journal of Medical Virology* 80:1790-1798.

18. Faleye TOC, Adewumi MO, Coker BA, Nudamajo FYN, Adeniji JA (2016). Direct Detection and Identification of Enteroviruses from faeces of health Nigerian children using a cell culture independent RT-Seminested PCR assay. *Advances in Virology* 2016.
19. Ferreira MSR, Xavier MPTP, Tinga ACC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM, de
20. Goldwater PN (1995). Immunoglobulin M capture immunoassay in investigation of coxsackievirus B5 and B6 outbreaks in South Australia. *Jour Clin Microbiol* 33:1628-1631.
21. Gondo K, Kusuhara K, Take H, Ueda K (1995). Echovirus type 9 epidemic in Kagoshima, southern Japan: Seroepidemiology and clinical observation of aseptic meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 14:787–791.
22. Gromeier M, Bossert B, Arita M, Namoto A, Wimmer E (1999). Dual Stem
23. Hall CE, Cooney MK, Fox JP (1970). The Seattle virus watch program. I. Infection and illness experience of virus watch families during a communitywide epidemic of echovirus type 30 aseptic meningitis. *Am J Public Health Nations Health* pp1456–1465.
24. Hall TA (1999). BioEdit: a user- friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids symp ser.* 41:95-8.
25. Harada S, Okada M, Yahiro S, Nishimura K, Matsuo S, Miyasaka J, Nakashima R, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Shinozaki K, Wakita T, Takeda N, Oka T (2009). Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto prefecture, Japan. *J. Med. Virol.* 81, 1117-1127.
26. He F, Kiener TK, Lim XF, Tan Y, Raj KVA, Tang M, Chow VTK, Chen Q, Kwang J (2013). Development of A Sensitive and Specific Epitope-Blocking ELISA for Universal Detection of Antibodies to Human Enterovirus 71 Strains. *PLOS one* Vol 8.
27. Hogle JM, Chow M, Filman DJ, (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 A resolution, *Science* pp. 1358-1365.
28. Hospital geral José Macamo (2015). Historial do hospital geral José Macamo. Sector de estatística.
in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg* 76, 522-527.

29. Instituto Nacional de Estatística, Ministério de saúde, 2013. Relatórios dos inquéritos sobre os indicadores múltiplos 2011.pp.144-151.
30. Jenista JA, Powell KR, Menegus MA (1984). Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *J Pediatr* 104: 685–690.
31. Johnston SLG & Siegel CS (1990). Presumptive Identification of Enteroviruses with RD, HEp-2 and RMK Cell Lines. *Journal of Clinical Microbiology* p. 1049-1050.
32. Khetsuriani N, Parashar UD (2009). Enteric viral infections. *ACP medicine* 1-11.
33. Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, Larsen GR, Adler CJ, Dorner AJ, Emini EA, Hanecak R, LeeJJ, Van der Werf S, Anderson CW, Wimmer E (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA.
34. Knowles NJ, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Lindberg AM Pallansch, MARZ,(2012). Picornaviridae. In King AMQ, Adams MJ, Carstens E.B & L. E.J (Eds.), *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* pp. 855-880. San Diego: Elsevier.
35. Kogon A, Spigland I, Frothingham TE, (1969). The virus watch program: A continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families. VII. Observations on viral excretion, seroimmunity, intrafamilial spread and illness association in coxsackie and echovirus infections. *Am J Epidemiol* 89:51-61.
36. Koike S, Taya C, Kurata T, Abe S, Ise I, Yonekawa H, Nomoto A (1991). Transgenic mice susceptible to poliovirus, *Proc Natl Acad Sci U S A* pp. 951-5.
37. Kuhn RJ (1997). Identification and biology of cellular receptors for the coxsackie B viruses group. *Curr Top Microbiol Immunol* 223: 209-226.
38. Lin MC, Chan YJ, Chen CJ, Tang RB, Wu KG (2008). Epidemiology and diagnostic methodology for enterovirus infection, including cerebrospinal fluid analysis: a 5 - year review. *J. Microbiol Immunol Infect* 41: 450 – 455.
Loops within the Poliovirus Internal Ribosomal Entry Site Control Neurovirulence. *J. Virol* 73(2): 958-964.
39. Ma JF, Straub TM., Pepper IL, Gerba CP, (1994). Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants, *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 4203-4206.
40. Maan HS, Chowdhary R, Shakya AKS, Dhole TN (2013). Genetic Variants of Echovirus 13, Northern India, 2010. *Emerging Infectious Diseases* vol 19, N.2.

41. Machado BC, Vieira HR, Alves MRM, Carmona RCC (2016). Avaliação do desempenho da PCR em tempo real para o diagnóstico de meningite por Enterovirus. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 75:1695.
42. Magnius LO, Saleh LH, Vikerfors T, Norder H (1988). A solid-phase reverse immunosorbent test for the detection of enterovirus IgM. *J Virol methods* 20:73-82.
43. Mandomando IM, Macete EV, Ruiz J, Sanz S, Abacassamo F, Valles X, Sacarlal J, Navia MM, Vila J, Alonso PL, Gascon J (2007). Etiology of diarrhea
44. Melnick JL (1996). Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. eds. *Fields Virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 655-712.
45. Melnick JL, Shaw EW, Curnen EC (1949). A virus isolated from patients diagnosed as non-paralytic poliomyelitis or aseptic meningitis. *Proc Soc Exp Biol Med* 71: 344-349.
46. Mertens T, Pika U, Eggers HJ (1983). Cross antigenicity among enteroviruses as revealed by immunoblot technique. *Virology* 129:431-442.
47. Minor PD, Ferguson M, Evans DM, Almond JW, Icenogle JP (1986).
48. Minor PD, Muir P (2009). Enteroviruses. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD, Schoub BD, editores. *Principles and practice of clinical virology*. Chichester: Wiley, 2009. p. 467–490.
49. Modlin J. Introduction to the Enteroviruses and Parechoviruses. In Mandell G,
50. Moore M, Kaplan MH, McPhee J, Bregman DT, Klein SW (1984). Epidemiologic, clinical, and laboratory features of Coxsackievirus B1-B5 infections in the United States, 1970-79. *Public Health Rep* 99 (5): 515-22.
51. Moraes AC, Castro FMM, (2014). *Diarreia Aguda JBM*. Março/Abril, 2014. VOL. 102.
52. Mota BDL, Monteiro JC, Freitas FB, Alves AS, Silveira E, Primo EG, Cunha CCC, Wanzeller ALM, Linhares AC, Tavares FN (2016). High circulation of non-polio enteroviruses among hospitalized children with acute gastroenteritis in Belém, Pará state, Northern Brazil. *Ver. Pan-Amoz saúde* 2016 7:79-83.
53. Namoto A, Koike S, Aoki J (1994). Tissue tropism and species specificity of poliovirus infection. *Trends Microbiol* 2: 47-51. *Natl Acad Sci U S A*, pp. 4887-91.

54. Nijhuis M, van Maarseveen N, Schuurman R, Verkuijlen S, de Vos M, Hendriksen K, van Loon AM (2002). Rapid and Sensitive Routine Detection of
 55. Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA (2000). Comparison of Classic and molecular Approaches for the Identification of Untypeable Enteroviruses. *J Clin Microbiol* p. 1170-1174.
 56. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA (1999). Typing of human Enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*; 37 (5):1288-93.
 57. Oberste MS, Nix NA, Maher K, Pallansch MA (2003). Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J. Clin Virol. Apr*; 26: 375-7.
 58. Organização Mundial da Saúde. Polio laboratory manual, 4th edition. World Health Organization, Geneva, Switzerland pp: 87-121. 2004.
 59. Oyero OG, Adu, FD, Ayukekbong JA (2014). Molecular characterization of diverse species enterovirus –B types from children with acute flaccid and asymptomatic children in Nigeria, *ELSEVIER* pp. 189-193.
 60. Pallansch MA, Roos R.P. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B & Straus SE. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins (2001). v2: 723767.
 61. Parashar UD, Bresee JS, Glass, RI (2003).The global burden of diarrheal disease in children. *Bull.World Health Organ* 81, 236.
 62. Patil PR, Chitambar SD, Gopalkrishna V (2015). Molecular surveillance of Non-polio Enterovirus Infections in Patients with Acute Gastroenteritis in Western India: 2004-2009. *J.Med.Virol*. DOI10.1002/jmv.
 63. Portes SAR, da Silva EE, Siqueira MM, de Filippis MB, Krawczuk MM, Nascimento JP (1998). Enteroviruses Isolated From Patients With Acute Respiratory Infections During Seven Years In Rio De Janeiro (1985-1991). *Rev. Inst. Med. Trop.S. Paulo* vol 40 n.6 São Paulo Nov./ Dec.1998.
 64. Poyry T, Kinnunen L, Hovi T, Hyypia T (1999). Relationships between simian and human enteroviruses. *J Gen Virol* 635-638.
- PP(2013). Non-polio enteroviruses and their association with acute diarrhea in children in India. *Elsevier* 17: 153-161.

65. Racaniello VR (2007). Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields in Virology* (5th ed., Vol. 1, pp. 796831). Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
66. Racaniello VR, Baltimore D, (1981). Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome, *Proc*
67. Rao DC, Babu MA, Raghavendra A, Dhananjaya D, Kumar S, Maiya
68. Rao DC, Reddy H, Sudheendra K, Raghavendra A, Varadharaj V, Edula S, Goparaju R, Ratnakar B, Rao ASRS, Maiya PP, Babu MA (2014). Non-polio enterovirus association with persistent diarrhea in children as revealed by a follow-up study of an Indian cohort during the first two years of life. *Journal of clinical virology* 61: 125-131.
69. Romero JR (1999). Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Detection of the Enteroviruses. *Arch Pathol Lab Med* vol 123.
70. Romero JR. (2007). Enteroviruses and Parechoviruses. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen MA, Pfaller MA & Landry ML (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (pp. 1392–1404). Washington D.C: ASM press.
71. Ruiz MP, Marí JMN, del Valle EP, Fraile MR (2003). Human rhabdomyosarcoma cells for rapid detection of enteroviruses by shell-vial assay. *Journal of Medical Microbiology* 52 789-791.
72. Silva PA, Stark K, Mockenhaupt FP, Reither K, Weitzel T, Ignatius R, Saad E, Seidu-Korkor A, Bienzle U, Schreier E, (2008). Molecular Characterization of Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, Oct. p. 3666–3670.
73. Torres JLAH, (2015). Aislamiento y caracterización de enterovirus en enfermedad tipo influenza en niños menores de 15 años, Piura 2011.
74. Witsø E, Palacios G, Cinek O, Stene LC, Grinde B, Janowitz D, Lipkin WI, Rønningen KS, (2006). High prevalence of Human Enterovirus A Infections in Natural Circulation of Human Enteroviruses, *journal of clinical microbiology* p.4095-4100.
75. Zhang G, Haydon DT, Knowles NJ, McCauley JW (1999). Molecular evolution of swine vesicular disease virus. *J Gen Virol* 168: 1361-1367.

9. APÊNDICES E/OU ANEXOS

Anexo 1



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE
IRB00002657

Exma Senhora
Dr^a Nilsa de Deus
INS

Ref: 348/CNBS/13

Data 26 de Novembro de 2013

Assunto: Parecer do Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS) sobre o estudo:
" *Vigilância Nacional de Diarreias Agudas em Crianças (ViNaDiA)* "

O Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS) analisou as correcções efectuadas no protocolo intitulado: " *Vigilância Nacional de Diarreias Agudas em Crianças (ViNaDiA)* ", conforme os requisitos da Declaração de Helsínquia,

Não havendo nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a realização do estudo, o CNBS dá a sua devida aprovação.

Todavia, o CNBS recomenda aos investigadores que o mantenham informado do decurso do estudo, salientando que esta aprovação ética não substitui a autorização administrativa.

Com as nossas mais cordiais saudações.

O Presidente

Dr. João Fernando Lima 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

Não existe até a presente data estudos sobre as causas das diarreias agudas em crianças em Moçambique. O conhecimento adequado das causas mais frequentes da diarreia aguda ajuda no uso correcto dos medicamentos, permite começar cedo o tratamento, produz dados epidemiológicos correctos, providencia razões para a tomada de medidas apropriadas para o isolamento dos pacientes e fornece informação de forma a adequar uma resposta rápida para prevenção de doenças. Uma parte da testagem será feita nos laboratórios dos hospitais onde as amostras serão recolhidas e o resto da amostra será enviada para os laboratórios centrais do Instituto Nacional de Saúde em Maputo, que possui condições para o resto dos processamentos.

3. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Caso o Senhor/a aceite que o seu filho participe no estudo, serão recolhidas amostras de fezes da criança e serão feitas perguntas pessoais e as respostas preenchidas num questionário preparado para o efeito. Por exemplo, algumas das perguntas que ser-lhe-ão feitas são: informação sobre a data de nascimento da criança, se mama, a quanto tempo a criança tem diarreia, a zona onde vive, a fonte de água, se tem animais em casa etc.

Depois do questionário, iremos colher uma amostra de fezes que será equivalente a 3 colheres de sopa (30 ml). Esta amostra será usada para a realização de análise para determinação das causas da diarreia. Serão também colhidas duas gotas de sangue para testagem de HIV. Considerando que a seropositividade da mãe em relação ao HIV possa ser um factor de risco, será recolhida no cartão da criança, informação se a mãe é HIV positiva ou negativa. Depois de colhidas as amostras, serão guardadas no congelador a -80°C e serão testadas para a detecção de bactérias, vírus, parasitas e fungos mais importantes para a doença diarreica. Depois de processar as amostras no laboratório, as mesmas amostras serão guardadas durante 5 anos e usadas para futuras análises.

4. VANTAGEM DE PARTICIPAÇÃO NA VIGILÂNCIA

O seu filho/a não terá nenhuma vantagem especial por participar na vigilância. Será beneficiário dos resultados dos testes que serão feitos e também de um melhor tratamento. O diagnóstico dos microrganismos que causam a diarreia vai levar a um tratamento mais eficaz da doença da criança no futuro, e este estudo irá ajudar no desenvolvimento de estratégias para prevenir as doenças diarreicas e as mortes causadas por diarreia.

5. RISCO, STRESS, DOR E DESCONFORTO ASSOCIADOS A SUA PARTICIPAÇÃO

Os riscos de participação são mínimos, porque não se trata de um estudo interventivo, no entanto, poderão constituir riscos mínimos o desconforto/dor durante a colheita da amostra de sangue. O pessoal envolvido no estudo será treinado para recolher informações sobre a doença com respeito e sensibilidade.

6. INFORMAÇÃO ACERCA DA CONFIDENCIALIDADE

Toda a informação colhida durante a participação neste estudo será tratada de forma confidencial. Os investigadores comprometem-se a não revelar a identidade do seu filho/a em qualquer publicação resultante deste estudo.

7. DIREITOS DURANTE A PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO

Os registos relativos à participação do seu filho/a serão usados para a monitoria clínica do mesmo. Será atribuído um número de identificação ao seu filho/a e este número será usado em todos os formulários e amostras laboratoriais. Apenas os investigadores do estudo, membros do comité de ética terão acesso à informação que liga nome da criança com o seu número do estudo.

Poderá ter acesso à informação clínica e dos exames laboratoriais do seu filho em qualquer altura. A participação na vigilância é completamente voluntária. Todos os testes laboratoriais são gratuitos. Se recusar participar continuará a receber tratamento no Hospital da mesma forma que vem a fazer. Se não estiver satisfeito com a participação no estudo, poderá pedir que retirem o seu filho/a em qualquer altura sem que isto afecte os seus cuidados médicos presentes ou futuros.

8. QUEM PODE CONTACTAR EM CASO DE DÚVIDAS E/OU PROBLEMAS?

Caso haja alguma dúvida relacionada a este protocolo deve contactar: Dra. Nilsa de Deus, Investigadora Principal do projecto (Tel: 84-3697690), Dra. Denise Chitsondo, médica e clínica do estudo ([Tel:828751540](tel:828751540)), Dra. Jorfélia Chilaúle, coordenadora geral (Tel: 824343470) e para questões éticas deve contactar o Comité Institucional de Bioética para Saúde do Instituto Nacional de Saúde (Tel: 21311038).

9. DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE:

Fui informado verbalmente e por escrito sobre este estudo e compreendo do quê se trata. Sei também a quem contactar se necessitar mais informação. Compreendo que a confidencialidade será mantida. Compreendo que sou livre de retirar o meu filho/a do estudo em qualquer altura sem que isto afecte os cuidados normalmente recebidos. Concordo que as amostras sejam guardadas durante 5 anos após o fim do estudo, e testadas no futuro para detecção de qualquer agente que os investigadores julguem importante ou realização de testes relevantes que possam melhorar o conhecimento sobre a área das diarreias. Concordo com a participação do meu filho/a neste estudo como sujeito voluntário e levarei uma cópia desta folha de informação para guardar.

Data e hora:

Nome do pai ou tutor Legal

Nome da testemunha

Assinatura (ou impressão do polegar) do pai ou tutor Legal

Assinatura da testemunha

10. DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR:

Eu, abaixo-assinado, defini e expliquei ao pai/tutor Legal numa linguagem que ele compreende, os procedimentos do estudo, os seus objectivos 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 o seu filho ou educando do estudo em qualquer altura sem que isto afecte os cuidados que recebe na clínica. Seguindo as minhas explicações o voluntário concorda participar no estudo.

Data e hora

Nome do investigador/técnico

Assinatura

Anexo 3

	Instituto Nacional de Saúde Departamento de Pesquisa	ViNaDiA
Revisão: 0.1 Página 1 de 3	Formulário de Informação Clínica	CRF_VINADIA_01

DADOS DO POSTO SENTINELA

Província	_ _ _ _ _ _ _ _ _
Nome do posto sentinela	_ _ _ _ _ _ _ _ _
Regime de atendimento	Amb <input type="checkbox"/> Inter <input type="checkbox"/>
	Dia - mês - ano
Data de admissão	_ _ - _ _ - _ _ _ _
Data da alta	_ _ - _ _ - _ _ _ _

A – DADOS DA CRIANÇA

33. Data do início da Diarreia _____|_____|34.
Data de fim
|_|_|-|_|_|-

35. Nº de episódios de diarreia/24 horas

36. A criança tem febre? Sim

37. Data de início _____|_____|-

38. Data de fim _____|_____|-

39. Característica das fezes:
Líquida Pastosa com sangue em forma de água

40. Outros sinais e sintomas clínicos para além de febre, vómitos e diarreia

41. Doenças associadas:

Malária Desnutrição Sim

Outra (indique) _____
Pneumonia

42. Tipo de tratamento: Oral Intravenoso Oral e
Intravenoso

43. A criança tomou antibióticos recentemente? Sim
Não

44. Quanto tempo? < 7 dias >
7 dias

45. Se Sim, indique os antibióticos administrados (resposta com base no processo clínico):

Cotrimoxazole	Amoxicilina	Amoxicilina+ Acido clavulanico	Ampicilgtina
Penicilina	Azitromicina	Gentamicina	Eritromicina
Acido Naldixico	Clorafenicol	Ciprofloxacina	Não

especificado

Outro

(especifique) _____

46. A criança tomou antibiótico antes da recolha das fezes? Sim
Não E - HIV

47. Em relação ao HIV, a criança é: POS
NEG DES

48. Se a criança é HIV positiva, há quanto tempo a criança foi diagnosticada? (meses)
|_|_|

49. Se for POS, valor de CD4 (cel/mm³)

Fervura Cloração Filtração

Outro (especifique)

62. A criança/cuidador lava as mãos antes e depois de usar a casa de banho? Sim
Não

63. A criança/cuidador lava as mãos antes das refeições? Sim
Não

G – FACTORES DE RISCO EPIDEMIOLÓGICOS E EXPOSIÇÕES

64. Na área onde vive houve algum surto de diarreia? Sim Não
Não sabe

65. A criança teve contacto com alguém com diarreia? Sim Não
Não sabe

Dia - - mês -

ano

66. Se sim, quando? |_|_|-|_|_|-
|_|_|_|_|

67. Com quem? _____

68. A criança participou numa festa ou outro evento social nos últimos 7 dias? Sim
Não Se sim, indique qual? _____

69. A criança esteve nalgum mercado ou centro comercial nos últimos 7 dias antes de adoecer? Sim
Não

Se sim, indique qual?

70. A criança viajou para fora da vila/cidade nos últimos 7 dias antes de adoecer? Sim
Não

Para onde?

71. A criança tem contacto com animais?
Sim Não

72. Se sim, quais? Cão Gato Vaca Porco Cabrito
Rato

73. Outros animais (indique)
|_|_|_|_|_|_|_|_|

H – VACINAÇÃO

74. A criança foi vacinada? (informação recolhida com base no cartão de vacinação da criança)

Sim Não Não sabe

75. Se sim, indique que vacinas recebeu:

1. BCG:

Sim Não

2. DTP+HBV: Sim
 Não

3. Pneumonia: Sim
 Não

4. Pólio: Sim
 Não

5. Sarampo: Sim
 Não

6. HIB: Sim
 Não

7. Rotavírus: Sim
 Não

Sim

Não

7.1. Se sim, indique qual:
 Rotarix Rotateq

7.2. Data de vacinação: 1ª dose |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|_| (Dia- Mês-Ano)
 2ª dose |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|_| (Dia- Mês-Ano)
 3ª dose |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|_| (Dia- Mês-Ano) 8.

Outra: _____

76. Qual foi a última vacina que a criança recebeu?
 |_|_|_|_|_|_|_|_|_|

77. A criança foi desparasitada? Sim
 Não

Não sabe

78. A amostra de fezes foi colhida?
 Sim Não

79. Amostra de sangue (DBS) foi colhida:
 Sim Não

I – DESFECHO DA CRIANÇA

80. Alta Morte Abandono Transferência

J – COMENTÁRIOS ADICIONAIS OU OBSERVAÇÕES

81. _____

82. Preenchido por: _____

Data |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|_| Assinatura

83. Revisto por: por _____

Data |__|__-|__|__-|__|__|__|__|

Assinatura
