

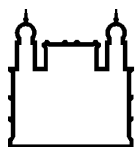
**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Doutorado em Programa de Pós-Graduação Medicina Tropical

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ROTAVIRUS A EM
CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS COM DIARREIA AGUDA, ANTES E
DEPOIS DA INTRODUÇÃO DA VACINA EM MOÇAMBIQUE
(2013-2018)**

JERÓNIMO SOUZINHO LANGA

Rio de Janeiro
26 de abril de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

JERÓNIMO SOUZINHO LANGA

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ROTAVIRUS A EM
CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS COM DIARREIA AGUDA, ANTES E
DEPOIS DA INTRODUÇÃO DA VACINA EM MOÇAMBIQUE**

(2013-2018)

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Medicina Tropical

Orientador (es): Prof. Dr. Eduardo de Mello Volotão
Prof. Dra. Nilsa Olivia Razao de Deus

RIO DE JANEIRO

26 de abril de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Langa, Jeronimo Souzinho.

Epidemiologia e caracterização molecular de rotavirus a em crianças menores de cinco anos com diarreia aguda, antes e depois da introdução da vacina em Moçambique - 2013-2018 / Jeronimo Souzinho Langa. - Rio de janeiro, 2019.

xx,110f f.; il.

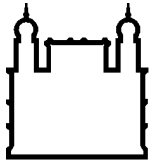
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2019.

Orientador: Eduardo de Mello Volotão.

Co-orientadora: Nilsa Olivia Razao de Deus.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Epidemiologia. 2. rotavirus. 3. vacine. 4. caracterização molecular. 5. Moçambique. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

JERÓNIMO SOUZINHO LANGA

EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ROTAVIRUS A EM CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS COM DIARREIA AGUDA, ANTES E DEPOIS DA INTRODUÇÃO DA VACINA EM MOÇAMBIQUE

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Eduardo de Mello Volotão

Prof^ª. Dra. Nilsa Olivia Razao de Deus

Aprovada em: 26 de Abril de 2019

EXAMINADORES:

Prof^ª. Dra. Caroline Cordeiro Soares - Instituto Oswaldo Cruz-Fundação Oswaldo Cruz (– IOC/FIOCRUZ)

Prof^ª. Dra. Vanessa Salete de Paula – IOC/FIOCRUZ

Prof^ª. Dra. Renata Carvalho de Oliveira Pires dos Santos – IOC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Horta – IOC/FIOCRUZ

Prof^ª. Dra. Gina Peres Lima dos Santos – Universidade Federal Fluminense -Rio de Janeiro (UFF/RJ).

Prof^ª. Dra. Adriana Gonçalves Maranhão – IOC/FIOCRUZ (suplente)

Prof^ª. Dra. Carmen Baur Vieira – UFF/RJ (suplente)

Rio de Janeiro, 26 de abril de 2019.

Dedico este trabalho aos meus filhos
Ludnei Halley e Yanicky Jerónimo e a minha esposa Celina Tivane pelo amor carinho
e ter suportado longo tempo da minha ausência.

AGRADECIMENTOS

Ao final deste trabalho, tenho que agradecer a todos que direta ou indirectamente contribuíram para que este se torne realidade; em especial a DEUS, pelo Dom da vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical- PGMT/IOC-FIOCRUZ e a coordenação de Doutorado do Instituto Nacional de Saúde de Moçambique (INS) que criaram as condições necessárias para a realização deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), ao Fundo Nacional de Investigação de Moçambique (FNI), BCMINS, Projecto PRÉ- PÓS pelo apoio financeiro,

Ao Ministério da Saúde da Moçambique e do Brasil pela oportunidade concedida.

Aos meus orientadores, Eduardo de Mello Volotão e Nilsa Razão de Deus, pela confiança depositada, pela orientação precisa, valiosa e pelos ensinamentos que me transmitiram durante todas as atividades realizadas;

A todos os colegas do Instituto Nacional de Saúde pelo inestimável apoio técnico e material concedido;

A toda Equipe da Vigilância Nacional de Doenças Diarreicas (Vinadia) pela valiosa contribuição, inestimável apoio técnico e material concedido.

A todos colegas do Laboratório de Isolamento Viral do Instituto Nacional de Saúde.

A toda equipe do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, de forma especial à Rosane Assis e ao Fábio Malta, pelo apoio e conhecimentos transmitidos.

À Plataforma de sequenciamento da FIOCRUZ, em especial às Dras. Aline, Beatriz e Carla, pelas quais tenho muita admiração e simpatia pelos seus ensinamentos e aconselhamento técnico e pelo apoio concedido;

Às coordenadoras do Programa de PGMT Dra. Martha Cecília Suárez Mutis e a Chefe Departamento de Ensino e Comunicação do INS, a Dra.Sónia Enosse pelas valiosas contribuições e constantes conselhos e incentivos;

À revisora da tese Dra. Coroline Soares pela sua valiosa contribuição na correção e revisão da tese;

Ao Dr Marcos Horta pelo apoio incondicional prestado na organização e análise dos dados;

À minha mãe e ao pai, “in memoriam”, pelo amor, apoio e dedicação incondicional que deles recebi durante a minha vida;

Ao Dr. Beatriz Elias pela sua humildade, habilidade, competência e conhecimentos indispensáveis para realização deste trabalho;

Aos meus amigos e colegas de bancada, Paulo Arnaldo, Nedio Jonas, Tomé Ramaden, Diocreciano Bero, Lucindo Pina, pelo encorajamento e que, de maneira sábia e exemplar, deram sua contribuição inestimável em todos momentos para elaboração e execução deste trabalho;

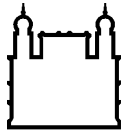
A Délcio Muteto, Assucenio Chissaque, Ezequias Siteo, Tania Namaigina, Sheridan Semá pela sua dedicação, valiosa e imprescindível contribuição na colheita dos dados e processamento das amostras;

À minha colega do curso Liliane Monteiro de Moraes, pelo companheirismo e ajuda na revisão da tese;

A todos os meus colegas do PGMT, pela amizade e companheirismo durante estes quatro anos;

A todos os participantes que aceitaram gentilmente fazer parte deste estudo;

A todos que de alguma forma prestaram sua contribuição neste trabalho que não foram citados diretamente.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ROTAVÍRUS A EM CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS COM DIARREIA AGUDA, ANTES E DEPOIS DA INTRODUÇÃO DA VACINA EM MOÇAMBIQUE

(2013-2018)

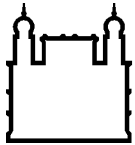
TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Jerónimo Souzinho Langa

RESUMO

A doença diarreica aguda permanece como um dos principais problemas de saúde pública no mundo, onde cerca de 37% das crianças menores de cinco anos morrem por ano, principalmente, em países com baixa renda. Dentre os diferentes agentes etiológicos, os rotavírus são considerados os principais causadores dessa doença. Duas vacinas já foram licenciadas contra a infecção por rotavírus, a vacina pentavalente RotaTeq e a monovalente Rotarix. Ambas as vacinas têm a capacidade para reduzir a gravidade da doença diarreica em crianças menores de cinco anos. O estudo multicêntrico Entérico Global mostrou que o rotavírus é um dos principais agentes causadores da doença diarreica em Moçambique. A fim de se reduzir a gravidade da infecção por rotavírus A Moçambique introduziu, em setembro de 2015, no seu Programa Alargado de Vacinação, a vacina monovalente Rotarix. O objetivo deste trabalho foi determinar o impacto da vacina na prevenção da infecção e na diversidade dos genótipos de RVA antes e após a introdução da vacina na cidade de Maputo. Para efeito, foi realizado um estudo descritivo transversal em crianças menores de cinco anos de idade, internadas com diarreia aguda nos Serviços de Pediatria do Hospital Central de Maputo, entre os anos de 2013 e 2018. No estudo, as características epidemiológicas e clínicas das crianças selecionadas foram obtidas através de um formulário padronizado. A identificação dos casos positivos para rotavírus em amostras de fezes foi realizado usando o teste de ELISA. As amostras positivas foram submetidas a genotipagem por semi-nested RT-PCR e, parte das amostras, foram posteriormente submetidas a análise de sequenciamento nucleotídico. Os dados recolhidos foram introduzidos na base de dados do pacote estatístico Excel 2010 e analisados através do programa estatístico SPSS versão 20 e pacote estatístico R. Foram

coletadas 802 amostras de fezes durante o período pré-vacinal (2013 - 2015) e 196 no período pós-vacinal (2016 - 2018), onde observou-se uma redução da mediana de casos de hospitalização por diarreia de 76%, diminuindo de 28,7% (82/284) no período pré-vacinal para 15,5% (10/66) no período pós-vacinal, ($p < 0,05$) em todas as faixas etárias. De forma similar, houve uma redução da mediana de 53,89% na proporção de internação por diarreia por rotavírus em crianças <12 meses de idade, de (28,3%) no período pré-vacinal para 13,04% no período pós-vacinal. Após a introdução da vacina verificou-se alteração dos picos sazonais habitualmente observados. As combinações de genótipos de rotavirus mais prevalentes no período pré-vacinal foram: G2P[4] em 2013, 62/86 (72,0%), G1P[8] 31/48 (65,0%) em 2014, G9P[8], 48 (69,0%) em 2015 e no período pós - vacinal foram: G1P [8] 5/10 (50,0%) em 2016 e 5/8(62,2%) 2017; 3G3P[8], G3P[4], G4P[6] 1/3 (33,0%) em 2018. Em Moçambique, após a introdução da vacina contra o rotavírus, foi observada uma redução nas hospitalizações associadas a rotavírus em todos os grupos etários com mais destaque em crianças <12 meses de idade. Uma grande diversidade de cepas de rotavírus circulou nos períodos pré e pós-introdução da vacina. Os resultados deste estudo sustentam evidências do impacto da vacinação contra o rotavírus destacando a importância na continuidade do programa assim como nos estudos de monitoramento de genótipos de rotavírus depois da introdução da vacina em Moçambique.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**EPIDEMIOLOGY AND ROTAVIRUS STRAINS CIRCULATING IN CHILDREN
UNDER FIVE YEARS OF OLD BEFORE AND AFTER VACCINE INTRODUCTION
IN MOZAMBIQUE**

PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

Jerónimo Souzinho Langa

ABSTRACT

Acute diarrheal disease remains one of the major public health problems in the world, where about 37% of children under five die each year due to diarrhea caused by Rotavirus (RVA), most of these deaths in low-income countries. Among the different etiological agents, RVA is one of the main causes of this disease in children under five years of age. There are two vaccines already licensed against Rotavirus infection, pentavalent vaccine RotaTeq and monovalent vaccine Rotarix. Both vaccines have the ability to reduce the severity of Rotavirus diarrheal disease in children under five years of age. The Global Enteric Multicenter Study (GEMS) has shown that Rotavirus is one of the major causative agents of diarrheal disease in Mozambique. In order to reduce the severity of Rotavirus infection, Mozambique introduced the Rotarix monovalent vaccine (RIX4414 RotarixMT) in its Extensive Vaccination Program (PAV) in September 2015. The objective of this work was to determine the impact of the vaccine in the prevention of infection and in the diversity of RVA genotypes before and after the introduction of the vaccine in the city of Maputo. We carried out a descriptive cross-sectional study in children under five years of age hospitalized with acute diarrhea in the Pediatric Services of Maputo Central Hospital between 2013 and 2018. In the study, we obtained the epidemiological and clinical characteristics of children through a standardized form. The ELISA rotavirus positive stool samples genotyped by semi-nested RT-PCR and part of the samples were submitted to nucleotide sequencing analysis. The collected data is into a database and analysed by the statistical package Excel 2016 and through the statistical program SPSS version 20 and R statistical package. Eighty samples of feces were collected during the pre-vaccination period (2013 - 2015) and 196 in the post-vaccination period (2016 - 2018), where a median reduction of 76% of cases of hospitalization for diarrhea was observed, decreasing from 28.7% (82/284) in the pre-vaccine

period to 15.5% (10/66) in the post-vaccination period, ($p < 0.05$) in all age groups. Similarly, there was a median reduction of 53.89% in the proportion of hospitalization for rotavirus diarrhea in children <12 months of age, from (28.29%) in the pre-vaccination period to 13.04% in the post- -vacinal. After the introduction of the vaccine, there was a change in the usual seasonal peaks. The most prevalent combinations of rotavirus genotypes in the pre-vaccine period were G2P[4] in 2013 62/86 (72%), G1P[8] 31/48 (65%) in 2014, G9P[8] 48/70 (69%) in 2015 and in the post - vaccination period were: G1P[8] 5 (50%) in 2016 and 5/8 (62.5%) in 2017; G3P[8], G3P[4], G4P[6] 1/3 (33%) in 2018. In Mozambique, after the introduction of the rotavirus vaccine, a reduction in rotavirus-associated hospitalizations it can be seen in all older age groups mainly in children <12 months of age. A wide variety of rotavirus strains circulated in the pre- and post-introduction periods of the vaccine. The results of this study support evidence of the impact of rotavirus vaccination highlighting the importance of program continuity as well as monitoring studies of rotavirus genotypes following the introduction of the vaccine in Mombique.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 Doença diarreica: magnitude do problema | 1 |
| 1.2 Conceito e etiologia da doença diarreica | 2 |
| 1.3 Rotavírus..... | 2 |
| 1.3.1 Histórico..... | 2 |
| 1.3.2 Classificação dos Rotavírus (RV)..... | 3 |
| 1.3.3 Estrutura e Organização do Vírus | 4 |
| 1.3.4 Proteínas estruturais e não estruturais | 6 |
| 1.3.4.1 Proteínas estruturais | 6 |
| 1.3.4.2 Proteínas não estruturais..... | 7 |
| 1.3 Biossíntese Viral | 8 |
| 1.4 Diversidade Genética dos Rotavírus..... | 10 |
| 1.5.1. As mutações pontuais | 10 |
| 1.5.3.As reestruturações genômicas (<i>rearranjos</i>) | 11 |
| 1.5.4. Constelações genóticas | 11 |
| 1.6 Imunologia..... | 13 |
| 1.7 Patogénese | 14 |
| 1.8 Diagnóstico da infecção por rotavírus | 15 |
| 1.8 Vacinas contraa infecção pelo rotavírus | 15 |
| 1.8.1 Outras vacinas licenciadas | 17 |
| 1.8.2. Vacinas em fase de desenvolvimento | 18 |
| 1.9 Epidemiologia da infecção por rotavírus | 19 |
| 1.10 Distribuições dos genótipos | 20 |
| 1.11 Distribuições dos genótipos na África | 21 |
| 1.12 Prevenção e controle | 23 |
| 1.13. Justificativa | 25 |
| 2. OBJETIVOS..... | 27 |
| 2.1. OBJETIVOS GERAL..... | 27 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 27 |

| | |
|---|----|
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 3.1 Tipo e local de estudo | 28 |
| 3.2 Área de estudo | 28 |
| 3.3 Período do estudo..... | 29 |
| 3.4 Populações de estudo | 29 |
| 3.5 Planos de amostragem | 29 |
| 3.6 Tamanho amostral..... | 29 |
| 3.7 Seleção dos Participantes..... | 30 |
| 3.7.1 Critérios de inclusão | 30 |
| 3.7.2 Critérios de exclusão..... | 30 |
| 3.8 Considerações Éticas | 30 |
| 1.9 Coleta de dados clínico-epidemiológicos e das amostras fecais..... | 31 |
| 3.10 Processamento das amostras fecais..... | 31 |
| 3.11 . Detecção de antígenos virais..... | 31 |
| 3.12 Extração de dsRNA viral | 32 |
| 3.13. Metodologias moleculares para genotipagem de rotavírus da espécie A | 32 |
| 3.13.1 Síntese de DNA complementar (cDNA)..... | 33 |
| 3.13.2. Reação de PCR e genotipagem | 34 |
| 3.13.3 Análise dos amplicons por eletroforese em gel de agarose a 1,5%..... | 36 |
| 3.14. Purificação dos produtos da RT-PCR..... | 37 |
| 3.15. Sequenciamento dos genes amplificados VP4 e VP7..... | 37 |
| 3.16 Análise de dados | 38 |
| 4. RESULTADOS | 40 |
| 4.2. Frequência dos casos de diarreia observados pré e pós-introdução da vacina RV1 | 40 |
| 4.3 Frequência de casos de RVA | 43 |
| 4.5 Distribuição temporal dos Rotavírus da espécie A | 47 |
| 4.6. Avaliação do impacto da vacinação contra o RVA em crianças menores de cinco anos em Moçambique | 49 |
| 4.7. Resultados dos modelos de regressão binomial logística (avaliação da gravidade clínica | 51 |
| 4.8. Distribuição dos genótipos G e P..... | 51 |
| 4.9. Distribuição comparativa da combinação dos genótipos G e P antes e depois da..... | 54 |

| | |
|---|----|
| 4.10 Distribuição dos Genótipos G e P por meses antes e depois da vacina RV1..... | 55 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 62 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 67 |
| 7. LIMITAÇÕES..... | 68 |
| 8. PERSPECTIVAS | 68 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 69 |
| ANEXOS | 85 |
| ANEXO 1. fluxograma de seleção das amostras..... | 86 |
| ANEXO 2 . documentos do periodo pré- vacinal | 87 |
| ANEXO 3 . Documentos do período pós vacinal..... | 99 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BLAST – Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local do inglês Do inglês: *Basic Local Alignment Search Tool*

C – Citosina, base nitrogenada.

CDC- Centros de Controle e Prevenção de Doenças
do inglês Centers for Disease Control and Prevention

cDNA – DNA complementar

CITSC– Centro de Investigação e Treino em Saúde de Chòkwé

dATP – Desoxiadenosina trifosfato

dCTP – Desoxicitidina trifosfato

dGTP – Desoxiguanosina trifosfato

DLP – Do inglês: *Double Layer Particles* – Partículas virais de camada dupla

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP– Deoxinucleotídeo trifosfatado

dsRNA - duplo segmento Ácido Ribonucléico

dTTP – Desoxitimidina trifosfato

dXTP – Desoxiribonucleotídeos trifosfatados

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

EGPA – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida do inglês: *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* –

EIA – Ensaio imunoenzimático

EUA – Estados Unidos da América

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g – Grama

G – Guanina, base nitrogenada.

GA – Gastroenterite Aguda

HCl – Ácido clorídrico

HRC - Hospital Rural de Chòkwé.

Hsp – Proteína de choque térmico do inglês: *heat shock protein* –

IME – Imunomicroscopia eletrônica

INF- α – Interferon alfa

INS– Instituto Nacional de Saúde

INSIDA- Inquérito Nacional de Saúde

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IRF – Fatores reguladores do Interferon do inglês: *Interferon regulatory factors* -

LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

M – Molar

ME – Microscopia eletrônica

mg – Miligrama

MISAU– Ministério da Saúde

mL – Mililitro

MLP – Monofosforil lipídeo.

mM – Milimolar

N – Normal

NaOH

NCBI – Centro Nacional de Informação em Biotecnologia do inglês: *National Center for Biotechnology Information*

nm – Nanômetros

NSP– Proteína não-estrutural do inglês: *non-structural protein*-,

nt – Nucleotídeo

°C – Grau Celsius

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – Fase aberta de leitura do inglês: *Open reading frame*

PA – Pró-análise

PAV- Programa Alargado de Vacinação

pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase do inglês: *Polymerase chain reaction* –

RE – Retículo endoplasmático

RER – Retículo endoplasmático rugoso

RNA – Ácido ribonucleico

RNA (-) – RNA de polaridade negativa

RNA (+) – RNA de polaridade positiva

RNAm – RNA mensageiro

RRV– TV – *Vacina tetravalente recombinante rhesus-humana do inglês: Rhesus-human reassortant tetravalent vaccine*

RT – Transcrição reversa do inglês: *Reverse transcription* –

RT-PCR – Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase do inglês: *Reverse transcription-Polymerase chain reaction* –

RV – Rotavírus

RVA – rotavírus da espécie A

SRO– Soro de Reidratantação Oral

T – Timina, base nitrogenada

TBE – Tris-Borato-EDTA

Tris – Hidroximetil-tris-aminometano

TRO– Terapia de Rehidratação Oral

U/μL – Unidades por microlitro

UTR – Do inglês: *Untranslated region* - Região não traduzida

VLS – Do inglês: *Viroplasm-like structures* - Partículas similares a viroplasmas

VP- Do inglês: *Viral protein* - Proteína viral

VP5* – Subunidade peptídica VP5 gerado por proteólise de VP4

VP8* – Subunidade peptídica VP8 gerada por proteólise de VP4

VPs – do inglês... Proteínas estruturais

WHO - Do inglês: *World Health Organization* – Organização Mundial da Saúde

µg/mL – Microgramas por mililitro

µL – Microlitro

INDICE DAS FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1. Esquema estrutural do genoma e partículas virais dos rotavírus A | 5 |
| Figura 1.2 Esquema representativo das principais etapas do ciclo de replicação dos rotavírus. | 10 |
| Figura 1.3 Distribuição geográfica da mortalidade associada ao Rotavírus da espécie A em crianças menores de cinco anos | 20 |
| Figura 1.4. Distribuição dos genótipos de rotavírus A | 21 |
| Figura 1.5. Distribuição temporal dos genótipos de rotavírus antes e depois da introdução da vacina na África Subsaariana | 22 |
| Figura 3.1. Mapa legenda da descrição da área de estudo..... | 28 |
| Figura 4.1.Número dos casos de testados e percentagem de RVA durante o período estudado. | 43 |
| Figura 4.3 Frequência de casos RVA, por bairro, no período pré-vacina | 45 |
| Figura 4.4. Frequência dos casos de RVA, por bairro, no período pós-vacina | 46 |
| Figura 4.5. Frequência dos casos negativos e positivos a RVA por meses antes e depois da introdução da vacina RV1.. | 48 |
| Figura 4.6. Distribuição da combinação dos genótipos G e P por ano, antes e depois da introdução da vacina. | 53 |
| Figura 4.7. Distribuição da combinação dos genótipos G e P por faixa etária, durante o período estudado..... | 54 |
| Figura 4.8 .Comparação das combinações dos genótipos G e P antes e depois da introdução da vacina RV1 em Moçambique. | 55 |
| Figura 4.9.Distribuição dos genótipos G por meses antes e depois da introdução da vacina RV1..... | 56 |

INDICE DAS TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1.1. Constelação genotípica de diferentes espécies de animais. | 12 |
| Tabela 4.1. Frequência de crianças menores de cinco anos observados e internados com diarreia na pediatria do HCM antes e depois da introdução da vacina..... | 40 |
| Tabela 4.2. Descrição das características clínicas e sociodemográficas das crianças hospitalizadas com diarreia aguda no HCM antes e depois da introdução da vacina, 2013 a 2018 | 41 |
| Tabela 4.3. Frequências dos casos positivos e negativos e estado de vacinação da criança observadas pós vacinal. | 42 |
| Tabela 4.4. Descrição dos locais de proveniência das crianças hospitalizadas no HCM com diarreia aguda, antes e depois da introdução da vacina RV1 | 42 |
| Tabela 4.5. Distribuição da redução dos casos de hospitalização por diarreia e RVA no HCM antes e depois da introdução da vacina em Moçambique, 2013 a 2018..... | 50 |
| Tabela 4.6. Frequência dos genótipos G de RVA antes e depois da introdução da vacina em Moçambique. | 52 |
| Tabela 4.7. Frequência dos genótipos P de RVA antes e depois da introdução da vacina em Moçambique. P[nt]*- genótipo P não tipáveis. | 52 |

INDICE DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1.1. Descrição das vacinas licenciadas e em uso | 17 |
| Quadro 1.2. Vacinas de rotavírus em fase de desenvolvimento..... | 18 |
| Quadro 3.1 Mistura de reagentes utilizados na reação de transcrição reversa | 33 |
| Quadro 3.2. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação e caracterização do gene VP4(P) de rotavirus da espécie A..... | 34 |
| Quadro 3.3. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação e caracterização do gene VP7 de rotavirus da espécie A..... | 35 |
| Quadro 3.4 Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7. | 36 |
| Quadro 3.5. Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento dos genes, VP4 e VP7 de rotavirus da espécie A..... | 38 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença diarreica: magnitude do problema

A doença diarreica continua sendo uma das principais causas de mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade no mundo (1). Estimativas indicam que em 2015, a doença diarreica foi responsável por cerca de 688 milhões de casos e 499.000 mortes, representando 8,6% (2)(3). Na África Subsaariana, apesar do número total de mortes por diarreia permanecer alto, houve uma grande redução, de mais de 100 óbitos por 100.000 habitantes ao ano de 214 para 113 casos (3). Em 2005, havia uma estimativa de 445 mortes [109,3–136,5] por 100.000 habitantes ao ano. Esta estimativa declinou para 277 mortes [66,6–83,0] por 100.000 habitantes, no ano de 2015. Este declínio é atribuído, em grande parte, às campanhas mundiais de tratamento da doença diarreica com a terapia de reidratação oral (TRO), a educação, o acesso à água e à melhoria das condições sanitárias (3).

Foi também observado declínio nas hospitalizações por diarreia em todo o mundo. Essa redução também foi atribuída ao advento do Programa de Controle da Doença Diarreica (PCDD) da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1980. Apesar deste fato, esta enfermidade ainda permanece como uma importante causa de hospitalização entre a população infantil, principalmente em áreas com altas prevalências de crianças soropositivas para o vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2 (HIV-1 e -2)(4).

Em Moçambique, a doença diarreica foi reportada como um dos principais problemas de saúde pública entre crianças menores de cinco anos, sendo considerada a terceira maior causa de morte na infância (5)(6). Segundo dados do Ministério de Saúde (MISAU), no seu relatório de 2009-2011, 10% (7669/76256) das crianças internadas perderam a vida no Hospital Central de Maputo sofrendo de diferentes enfermidades, onde a doença diarreica e gastroenterite de origem infecciosa contribuíram com aproximadamente 2% para a taxa de mortalidade no mesmo período de análise, sendo o maior número registrado em crianças com menos de 1 ano (7).

1.2 Conceito e etiologia da doença diarreica

O episódio diarreico agudo é definido pela presença de três ou mais evacuações em um período de 24 horas; caracteriza-se pelo início abrupto, curso potencialmente autolimitado e perdas fecais anormais, principalmente, de água e eletrólitos (8).

Diversos parasitas, bactérias e vírus podem estar envolvidos na etiologia da diarreia. Durante as últimas quatro décadas, o conhecimento do espectro dos enteropatógenos que causam diarreia vem aumentando, principalmente através da identificação de novos vírus, dentre os quais destacam-se: os rotavírus, os adenovírus entéricos, os astrovírus, os calicivirus humanos (1) (2). A infecção pelos rotavírus (RV) é uma das mais importantes causas de morbimortalidade relacionada à diarreia no mundo; sendo a causa mais frequente de gastroenterite grave tanto em países em desenvolvimento quanto desenvolvidos. Os rotavírus podem infectar humanos e outras espécies de mamíferos e aves, podendo ocorrer de forma subclínica (2) (9).

No mundo, o rotavírus da espécie A (RVA) é considerado o principal agente etiológico da doença diarreica em menores de 5 anos e é a causa mais comum de gastroenterite e desidratação grave, sendo responsável por 30% de óbitos nos países subdesenvolvidos (1) (3).

Na África Subsaariana há pouca informação sobre a importância epidemiológica dos rotavírus em crianças menores de 5 anos, apesar da alta prevalência da infecção pelos vírus HIV-1 e 2 (10) (11).

1.3 Rotavírus

1.3.1 Histórico

Os relatos de diarreia em seres humanos são anteriores a Hipócrates (460 a.C.-377 a.C.). Porém, só no século XIX, os avanços da Bacteriologia e Parasitologia levaram a elucidação da etiologia de uma parte das doenças diarreicas. Apesar desses avanços, ficou evidente que uma proporção significativa dos surtos de diarreia aguda não podia ser atribuída a esses agentes. Assumiu-se que muitos casos de gastroenterite aguda deveriam ter outras etiologias, incluindo os vírus (12).

Achados históricos demonstram que os rotavírus (RV) foram descobertos pela primeira vez há 50 anos no exsudado de macacos e biópsia intestinal de camundongos por microscopia eletrônica em 1963 (13). Até o início da década 1970, vários estudos foram realizados visando associação entre vírus e a doença diarreica em humanos, principalmente

em crianças. Porém, somente em 1972, o vírus de *Norwalk* foi descrito como agente etiológico em um surto de gastroenterite aguda, sendo utilizada a microscopia eletrônica (ME) como metodologia de diagnóstico (14).

Entretanto, a etiologia viral de gastroenterite por rotavírus em humanos só foi comprovada por Bishop (15), na Austrália, através da observação de partículas virais de aproximadamente 70 nm de diâmetro pela análise pela ME de cortes ultrafinos de biópsia de duodeno de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda. No mesmo ano Flewett e colaboradores também observaram pela ME partículas virais em fezes clarificadas de crianças com diarreia aguda (16).

A partir destas descrições, a ME passou a ser utilizada como metodologia para a investigação de vírus em amostras fecais. Inicialmente, estes vírus receberam denominação de *Orbivirus-like agent* (15), de *Reovirus-like agent* (12) e, considerando a visualização da dupla camada proteica, de *Duovirus* (17). Posteriormente, foi proposto que estes vírus constituíssem um novo gênero (*Rotavírus*), na família *Reoviridae*, pelo aspecto semelhante ao de roda (do latim *rota*), quando a partícula viral é observada em contraste negativo pela ME (16).

Desde então, os rotavírus são considerados os principais agentes etiológicos da doença diarreica grave em crianças, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (9). E, ao longo de quatro décadas, os rotavírus têm sido objeto de estudos, integrando dados que abrangem desde os primeiros achados pela ME até a corrente caracterização molecular das amostras virais circulantes e os ensaios de campo com vacinas (18).

1.3.2 Classificação dos Rotavírus (RV)

Os Rotavírus pertencem à família *Reoviridae*, subfamília *Sedoreovirinae*, gênero *Rotavírus*. Esse gênero apresenta oito espécies distintas, RVA a RVH, com base nos diferentes epítomos encontrados na proteína VP6. As espécies RVA, RVB, RVC e RVH são descritas em humanos e em animais, diferentemente das espécies RVD a RVG, que até o momento foram identificadas apenas em animais (19). Cada espécie apresenta um perfil característico quando submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) (20).

Recentemente mais duas espécies foram propostas (RVI-RVJ), identificadas em cães e morcegos na Hungria e Sérvia, respectivamente, mas ainda aguardam confirmação pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (21) (22). No mesmo contexto, com base na reatividade da proteína VP6 para anticorpo monoclonal específico e dados da sua sequência,

os rotavírus A (RVA) são ainda classificados em quatro subgrupos (SGI, SGII, SGI + II e SG nãoI / nãoII) e dois genogrupos *Wa-like* e *DS-1-like* (23).

Além da proteína VP6, duas proteínas do capsídeo externo, VP7 e VP4 têm sido tradicionalmente usadas. Com base nos genes que codificam para essas proteínas, os RV possuem uma classificação binária em genótipos G (VP7 - glicoproteína) e P (VP4 - sensível à clivagem proteolítica) (20). Até o momento, foram descritos 36 genótipos G e 51 genótipos P (24).

Recentemente, uma nova classificação dos RV foi proposta, recomendando o sequenciamento de todo o genoma viral, baseado na caracterização molecular e análise filogenética de cada segmento gênico, de 53 protótipos (34). Os diferentes genótipos descritos para cada um dos segmentos são divididos segundo valores de corte, de acordo com a similaridade nucleotídica, resultando nas chamadas constelações genótípicas, que são designadas com uma letra para cada segmento gênico, seguido de um número arábico (x), na seguinte ordem: Gx; P[x]; Ix; Rx; Cx; Mx; Ax; Nx;Tx; Ex; Hx, que correspondem as proteínas: VP7; VP4; VP6; VP1; VP2; VP3; NSP1; NSP2; NSP3; NSP4; NSP5/6, respectivamente (25). Este sistema de classificação é o mais elaborado e é o mais frequentemente utilizado, pois permite uma análise completa da diversidade genética entre diferentes linhagens de rotavírus (26) (27).

1.3.3 Estrutura e Organização do Vírus

A partícula viral completa e infecciosa caracteriza-se como não envelopada, apresentando aproximadamente 100nm de diâmetro, considerando as suas projeções de simetria icosaédrica, e possui três camadas concêntricas de proteínas que envolvem o genoma de 11 segmentos de RNA de dupla fita (RNAdf) (28).

Dentre as proteínas codificadas pelos segmentos genômicos, seis são estruturais: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7; e seis, não estruturais: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6 (29) (figura 1.1).

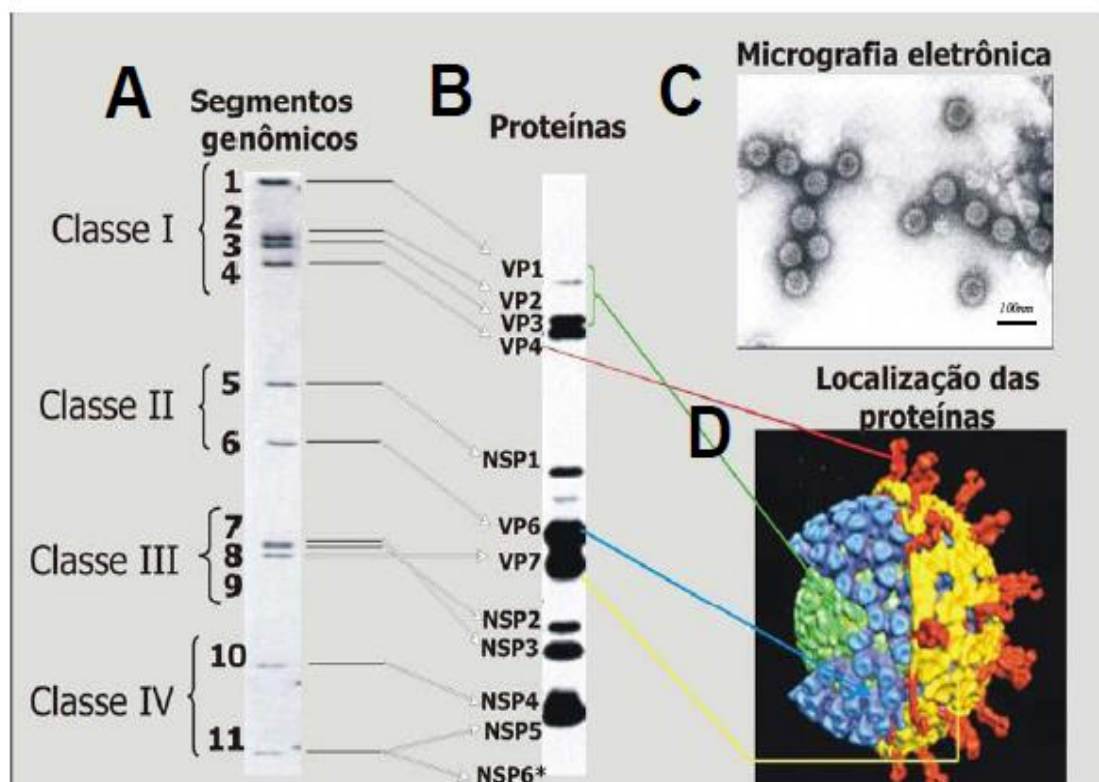


Figura 1.1. Esquema estrutural do genoma e partículas virais dos rotavírus A: eletroforese em gel de poliácridamida dos 11 segmentos do genoma do rotavírus da espécie A de origem símia (SA-11). B: gel de poliácridamida para visualização das diferentes proteínas estruturais (VP1 – VP4, VP6 – VP7) e não estruturais (NSP1 – NSP6) de SA-11. C: micrografia eletrônica de rotavírus. D: reconstrução em 3 dimensões do vírion de SA-11 (Figura adaptada por Conner & Ramig, 1997).

Os segmentos gênicos estão entre 667 e 3302 pb de comprimento e são monocistrônicos, exceto o segmento genético 11, que é bicistrônico e em algumas cepas de RV, codifica duas proteínas (NSP5 e NSP6) (29).

O capsídeo é composto por três camadas de proteínas concêntricas. A camada externa é formada por duas proteínas: VP7 e VP4 (30). A proteína VP6 constitui a camada intermediária, enquanto que a camada interna é formada por VP2, que envolve as proteínas VP1 (RNA polimerase dependente) e VP3 (enzima de encapsulamento viral)(31).

1.3.4 Proteínas estruturais e não estruturais

1.3.4.1 Proteínas estruturais

VP1

Dentre as proteínas que constituem o capsídeo interno, a VP1 é a proteína menos abundante. Juntamente com a VP2 e VP3, compõem o core viral e formam o complexo de replicação, que tem papel fundamental na biossíntese viral (32)(33).

VP2

É a proteína mais abundante do core viral. Faz parte do complexo de replicação e liga-se tanto à VP1 quanto à VP3, através de um domínio na sua porção N-terminal. A interação proteica entre VP1, 2 e 3 é um fator limitante na replicação e transcrição do genoma viral (34)(35).

Além disso, a superfície externa da proteína VP2 interage com a proteína VP6 nos estágios iniciais da morfogênese viral. A interação entre VP2 e VP6 é fundamental para a formação de partículas consideradas imaturas ou incompletas, isto é, aquelas que possuem apenas duplo capsídeo proteico (DLPs). Esta interação também demonstra importância na atividade transcricional da partícula completa que será formada e na indução da proteção contra a infecção por rotavírus. Já é conhecido o efeito individual na VP6 da indução da proteção. Entretanto, pouco se sabe sobre a imunogenicidade da VP2 (36) (37).

VP3

Apresenta atividade de guanililtransferase e provavelmente está envolvida na adição do Cap (Proteína Ativadora de Catabólitos) presente na extremidade 5' de todos os mRNAs virais (38).

VP4

Possui um sítio de clivagem da tripsina. A clivagem dessa proteína na presença da tripsina gera dois produtos proteicos a VP5* e VP8*, o que aumenta a infecciosidade viral. A entrada do vírus na célula é dependente dessa clivagem (34). Esta proteína demonstrou ter papel essencial no ciclo replicativo viral, não só pela adesão e internalização à célula, mas também actividade biológicas de hemaglutinação, indução da síntese de anticorpos neutralizantes e virulência (39). O gene que codifica para VP4 é responsável pela classificação dos P genótipos dos RVA (40) (41).

VP6

É a proteína viral mais abundante dos RV e possui, na superfície, determinantes antigênicos altamente conservados que permitem a classificação dos rotavirus em diferentes espécies (RVA - RVE) e subgrupos de RVA (I, II, I+II, não-I e não-II) (41) .

Ela é constituinte do capsídeo intermediário e é formada por dois domínios: um que interage com VP7 e VP4 do capsídeo externo; e outro que interage com VP2 do core. Assim, VP6 participa em duas funções importantes do vírus: i) adsorção e penetração na célula e ii) transcrição do RNAd.f. (42) (39).

VP7

A glicoproteína VP7 é a mais imunogênica dentre as constituintes do capsídeo externo e é responsável pela síntese de anticorpos neutralizantes (43).

A VP7 modula a atividade de VP4 no processo de adsorção e entrada dos RVA na célula, interagindo com proteínas da família das integrinas, na superfície celular, após o processo de adsorção mediado pela VP4 (41).

1.3.4.2 Proteínas não estruturais

NSP1

É a proteína mais variável de todas podendo apresentar até 65% da diversidade de sequência entre as linhagens de RV. Apresenta associação com o citoesqueleto celular favorecendo a ligação vírus-célula. Além disso, NSP1 apresenta a função peculiar de modular a ativação de interferon (IFN) tipo I, que é essencial na resposta imune inespecífica em casos de infecção viral (44) (45).

NSP2

É uma proteína altamente conservada e expressa em altas concentrações nas células infectadas. É frequentemente encontrada associada à NSP5 e, dessa forma, são responsáveis pelas funções de transcrição, tradução, replicação e empacotamento do RNAd.f. (46).

NSP3

Esta proteína está envolvida no processo de tradução do RNA viral, sendo evidenciado que facilita a transcrição do mRNA dos RV nos ribossomos (47) (48).

NSP4

A NSP4 está envolvida nos estágios terminais da maturação viral no retículo endoplasmático e, recentemente, foi demonstrado que essa partícula apresenta atividade de enterotoxina (49). Estudos demonstram a multifuncionalidade desta proteína que foi a primeira enterotoxina viral descrita como sendo diretamente responsável pelas manifestações clínicas mais recorrentes aos RVA, induzindo um mecanismo de diarreia secretória (50).

NSP5

É uma proteína dimérica fosforilada que apresenta atividade autoquinase e de ligação ao RNA (51). Esta proteína está envolvida em múltiplas funções dinâmicas e de regulação do viroplasma (52). Interage com VP1, VP2 e NSP6 formando corpúsculos virais de inclusão; também interage com a NSP2 e outras proteínas durante a replicação do genoma (53).

NSP6

É encontrada principalmente no viroplasma e interage com NSP5, tendo participação nos processos de replicação e encapsidação viral. Variantes de RV não codificam esta proteína e outras apresentam baixos níveis de expressão, que indicam que esta proteína apresenta papel regulatório não essencial na replicação viral (54).

1.3 Biossíntese Viral

A biossíntese dos RV ocorre no citoplasma das células absorptivas diferenciadas, que se encontram na porção apical das vilosidades do intestino delgado. As partículas infecciosas são liberadas no lúmen intestinal e o processo replicativo continua na área distal do intestino delgado (55)

Em cultura de células, a infecciosidade dos RV é aumentada pela presença da enzima proteolítica tripsina, que promove clivagem da proteína VP4, separando-a em duas subunidades: VP5* e VP8*, que permanecem acopladas à partícula viral (30) (56). No lúmen intestinal do hospedeiro, essa enzima tem origem na liberação de secreções pancreáticas (57).

A entrada do RV na célula é possível por meio da ligação da subunidade VP8* ao ácido siálico e da interação de VP5* com integrinas e proteínas (Hsp) (58)(59). Recentemente, isso foi expandido para uma ampla diversidade de glicanos, sugerindo que VP8* é um forte determinante para uma variedade de hospedeiros (60)(61). Além disso, concentrações apropriadas de íons Ca^{2+} são necessárias para manter a estabilidade da partícula viral e, principalmente, a estabilidade de VP7. A remoção dos íons Ca^{2+} dissocia os

trímeros de VP7 em monômeros, liberando a VP7 do vírion e iniciando a penetração, induzida por mudanças conformacionais que ocorrem na proteína VP4 (62)(63).

Após a adsorção à célula hospedeira, ocorre a penetração do vírus no citoplasma celular (Figura 1.2). A estratégia de penetração viral ainda não foi totalmente esclarecida, entretanto, alguns mecanismos são propostos : *i*) endocitose mediada por receptor (64)e, *ii*) penetração direta por meio de *rafts* lipídicos, que são microdomínios lipídicos com alta densidade de glicosfingolípídeos (moléculas com preponderância de cadeias hidrocarbonadas) e um conjunto específico de proteínas, tais como Hsp e integrinas. É possível que haja outros mecanismos de penetração viral que atuem nos RV, como já foi descrito para outros vírus (adenovírus, poliovírus e reovírus) (65).

No citoplasma, ocorre a perda do capsídeo externo, liberando as partículas virais de camada dupla (DLP). Este evento sinaliza para a proteína VP1 o momento de início da transcrição do material genético, produzindo as fitas RNA de polaridade positiva (RNA+). Estas servirão como fita molde para síntese de novas moléculas de RNA e tradução das proteínas virais, estruturais e não estruturais. As proteínas sintetizadas e o RNA fita simples (RNAf.s.) viral são reunidos no citoplasma da célula infectada, constituindo um material amorfo denominado viroplasma (66). O capsídeo intermediário (VP6) envolve o *core* (RNAf.s. e VP1-VP3) formando a partícula viral incompleta, com aproximadamente 50 nm de diâmetro. Nesta etapa, VP1-3 sintetizam a fita de polaridade negativa, completando a segunda fita do RNAdf dos RV. Assim, as DLP deixam o viroplasma e seguem para o RE Rugoso (RER), adquirindo o capsídeo e um envoltório transitório.

As proteínas glicosiladas VP7 e NSP4 são sintetizadas pelos poliribossomas do RER. A camada de VP7 forma o capsídeo externo e a NSP4 ancora as DLPs, por intermédio de VP6 e VP4, propiciando o brotamento das DLPs para o interior do RE, onde ocorre a montagem das partículas com capsídeo externo, resultando em partículas virais maduras com diâmetro aproximado de 100 nm. Finalmente, o ciclo infeccioso termina quando a progênie viral é liberada por lise da célula hospedeira Figura 1.2 (34).

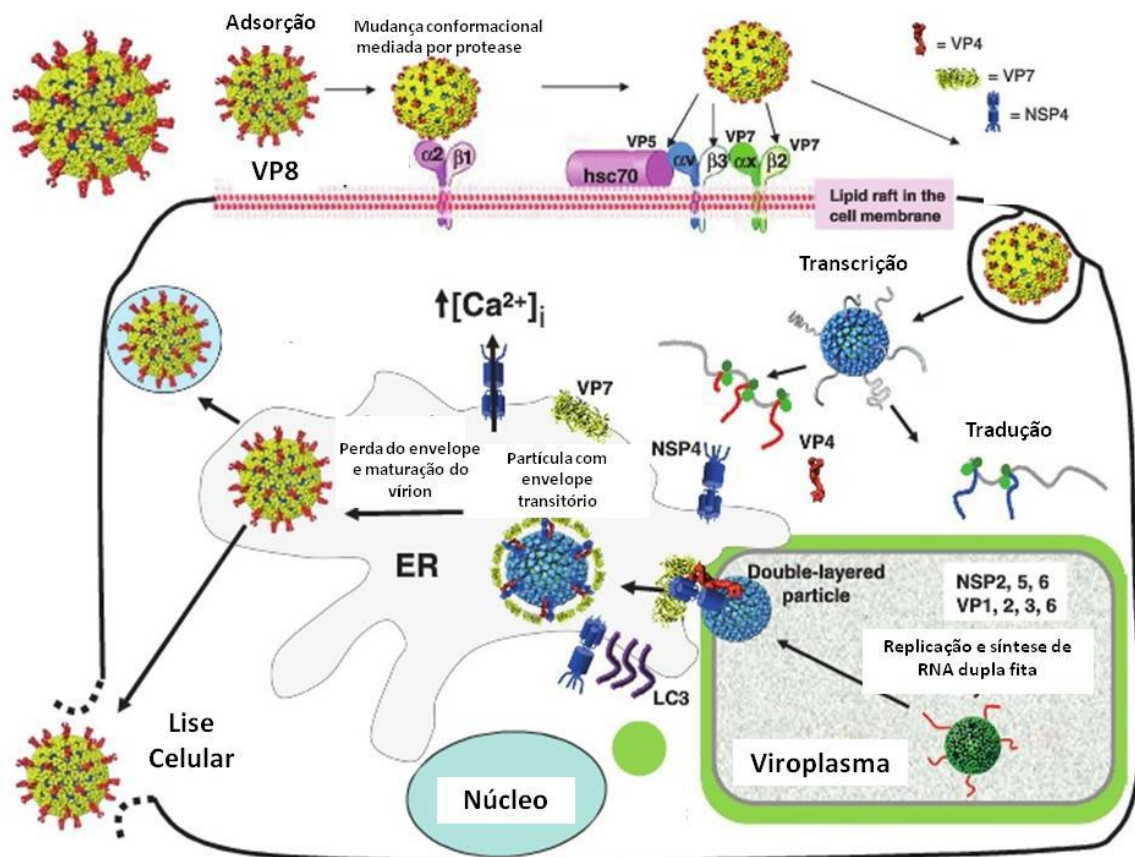


Figura 1.2 Esquema representativo das principais etapas do ciclo de replicação dos rotavírus. O viroplasma é o local de síntese das DLPs. Após formadas, estas partículas se ligam a NSP4 presente na membrana do RE e brotam para dentro desta organela, recebendo um envelope transitório. Este envelope é perdido e as proteínas do capsídeo externo são adicionadas à partícula. Os vírions completos são liberados das células infectadas por um transporte vesicular não convencional que não passa pelo Complexo de Golgi (67)

1.4 Diversidade Genética dos Rotavírus

A diversidade genética dos RVA está associada a diferentes mecanismos de evolução: mutação pontual, rearranjo genômico (recombinação intramolecular) e reestruturação (*reassortment*)(68).

1.5.1. As mutações pontuais

São o resultado da propensão ao erro da RNA polimerase dependente de RNA codificada pelo segmento do gene VP1(69). O acúmulo de mutações pontuais pode ser evidenciado por técnicas de sequenciamento de nucleotídeos. Estas mutações definem novas linhagens e sublinhagens de um genótipo (68). Dessa forma, torna-se fundamental a análise

sistemática de sequências dos vírus circulantes na população, com a finalidade de identificar a frequência dessas mutações no genoma dos RVA(70).

1.5.2. Mutações segmentais

São alterações na sequência do segmento genômico, algumas vezes na forma de deleção ou, mais frequentemente, como duplicação (70). As contribuições genéticas de rearranjos não são muito importantes embora, os segmentos que codificam para proteínas não estruturais, particularmente o NSP5, parecem ser mais susceptíveis a rearranjos gênicos que os rearranjos dos segmentos que codificam para proteínas estruturais (71). A visualização deste tipo de mecanismo pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) caracteriza-se pela ausência de alguns segmentos da sua posição usual e/ou o aparecimento de bandas adicionais (72).

1.5.3.As reestruturações genômicas (*rearranjos*)

Ocorrem quando uma célula é infectada por dois rotavírus ao mesmo tempo. Esse mecanismo foi descrito pela primeira vez por Matsuno e colaboradores (73), que realizaram experimentos de coinfeção de cultura celular com RVA bovino (Lincoln) e RVA símio (SA-11), obtendo assim, o primeiro clone reestruturado. Por meio de comparações dos segmentos de RNAfd do clone com os parentais, observou-se que o genoma reestruturado apresentava os segmentos 4, 5, e 10 de SA-11 e segmentos 1, 2, 3, 6 e 11 de bovino, porém não foi possível determinar a origem dos outros segmentos (7, 8 e 9). A presença de reestruturações *in natura* com especificidade animal parece mais frequente nos países em desenvolvimento, provavelmente facilitada pela precariedade das condições de saneamento básico e higiene, defesas imunológicas limitadas, desnutrição, além do estreito relacionamento entre o homem, animais domésticos e silvestres, proporcionando infecções mistas e, conseqüentemente, maior possibilidade de rearranjos “*reassortment*” (74).

1.5.4. Constelações genotípicas

Até o momento são reconhecidas duas principais constelações genotípicas das estirpes de RVA, G1 / 3/4-P [8] -I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 (Wa-like) e G2-P [4] -I2-R2-C2-M2 -A2 - N2 - T2 - E2 - H2 (DS - 1 - like). O genogrupa *Wa-like* humano compartilha muitos segmentos gênicos com RV suíno encontrado em combinação com P[8] e *DS-1-like* tem um ancestral comum com RV bovino encontrado em combinação com P[4] (75).

Outro pequeno genogrupo de constelação de genótipos *AU-1-like* foi detectado em seres humanos (G3-P [9] -R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3). Considera-se que os RV humanos AU-1 compartilham antepassados comuns com RV felino e canino (76). Esta constelação de genogrupo *AU-1-like* esporadicamente é isolada em humanos (75). A tabela 1.1 apresenta, de forma geral, as constelações genotípicas de diferentes espécies animais, incluindo humanos.

Tabela 1.1. Constelação genotípica de diferentes espécies de animais.

| | nome da estirpe | Constelação Genotípica | | | | | | | | | | | | # estirpes disponíveis GenBank ^a |
|--|--|---------------------------------------|-----|-------|-----|-----|-----|-------|------|------|------|------|------|---|
| | | | VP7 | VP4 | VP6 | VP1 | VP2 | VP3 | NSP1 | NSP2 | NSP3 | NSP4 | NSP5 | |
| A | RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P1A[8] | Human Wa-like | G1 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 | 167 |
| | RVA/Human-tc/USA/P/1974/G3P1A[8] | | G3 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 | 79 |
| | RVA/Human-wt/USA/DC5115-Bethesda/1977/G4P[8] | | G4 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 | 11 |
| | RVA/Human-wt/BEL/B3458/2003/G9P[8] | | G9 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 | 21 |
| | RVA/Human-wt/BEL/B4633/2003/G12P[8] | | G12 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 | 7 |
| | RVA/Human-tc/BHA/IAL28/1992/G5P[8] | | G5 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 | 1 |
| | RVA/Human-wt/CIV/6736/2004/G8P[8] | | G8 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 | 5 |
| | RVA/Human-wt/NGA/6717ARN/2002/G10P[8] | | G10 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 | 4 |
| RVA/Human-wt/BGD/Matlab36/2002/G11P[8] | G11 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 | 1 | | |
| B | RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P1B[4] | Humano DS-1-like | G2 | P[4] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N2 | T2 | E2 | H2 | 9 |
| | RVA/Human-wt/DEU/GER1H/2009/G8P[4] | | G8 | P[4] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N2 | T2 | E2 | H2 | 2 |
| | RVA/Human-wt/BEL/B1711/2002/G6P[6] | | G6 | P[6] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N2 | T2 | E2 | H2 | 1 |
| | RVA/Human-wt/COD/DRC88/2003/G8P[8] | | G8 | P[8] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N2 | T2 | E2 | H2 | 1 |
| | RVA/Human-wt/COD/DRC88/2003/G8P[6] | | G8 | P[6] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N2 | T2 | E2 | H2 | 1 |
| | RVA/Human-tc/IND/69M/1990/G8P[4]10 | | G8 | P[10] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N2 | T2 | E2 | H2 | 1 |
| | RVA/Human-wt/ZAF/GR10924/1999/G9P[6] | | G9 | P[6] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N2 | T2 | E2 | H2 | 1 |
| C | RVA/Human-tc/KEN/AK26/1982/G2P[4] | Wa-like x DS-1-like Recombinante | G2 | P[4] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N1 | T2 | E2 | H2 | 1 |
| | RVA/Human-wt/CAM/6809/2000/G8P[6] | | G8 | P[6] | I2 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 | 1 |
| | RVA/Human-wt/CIV/6755ARN/2002/G10P[8] | | G10 | P[8] | I2 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 | 1 |
| | RVA/Human-tc/PHL/L26/1987/G12P[4] | | G12 | P[4] | I2 | R2 | C2 | M1/M2 | A2 | N1 | T2 | E2 | H1 | 1 |
| | RVA/Human-wt/ZAF/3133WC/2009/G12P[4] | | G12 | P[4] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 | 1 |
| | RVA/Human-wt/BGD/Matlab13/2003/G12P[6] | | G12 | P[6] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T2 | E1 | H1 | 1 |
| | RVA/Human-wt/BGD/N26/2002/G12P[6] | | G12 | P[6] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N1 | T2 | E6 | H2 | 1 |
| | RVA/Human-wt/BGD/RV161/2000/G12P[6] | | G12 | P[6] | I2 | R2 | C2 | M2 | A2 | N2 | T2 | E1 | H2 | 1 |
| D | RVA/Human-tc/JPN/AU-1/1982/G3P3[9] | Humano AU-1-like | G3 | P[9] | I3 | R3 | C3 | M3 | A3 | N3 | T3 | E3 | H3 | 1 |
| | RVA/Human-tc/THA/T152/1998/G12P[9] | | G12 | P[9] | I3 | R3 | C3 | M3 | A12 | N3 | T3 | E3 | H6 | 1 |
| E | RVA/Human-wt/IND/N155/2003/G10P[11] | Wa-like Human x Bovine Reassortant | G10 | P[11] | I2 | R2 | C2 | M2 | A1 | N1 | T1 | E2 | H3 | 1 |
| | RVA/Human-tc/IND/I321/XXXX/G10P[11] | | G10 | P[11] | I2 | Rx | Cx | Mx | A1 | N2 | T1 | E2 | Hx | 1 |
| F | RVA/Human-tc/ITA/PA169/1998/G6P[14] | bovino humano | G6 | P[14] | I2 | R2 | C2 | M2 | A3 | N2 | T6 | E2 | H3 | 3 |
| | RVA/Human-wt/HUN/Hun5/1997/G6P[14] | | G6 | P[14] | I2 | R2 | C2 | M2 | A11 | N2 | T6 | E2 | H3 | 4 |
| | RVA/Human-wt/HUN/BP1062/2004/G8P[14] | | G8 | P[14] | I2 | R2 | C2 | M2 | A11 | N2 | T6 | E2 | H3 | 1 |
| | RVA/Human-tc/GBR/A64/1987/G10P11[14] | | G10 | P[14] | I2 | R2 | C2 | M1 | A3 | N2 | T6 | E2 | H3 | 1 |
| G | RVA/Cow-tc/FRA/RF/1982/G6P[1] | Artiodactyl Bovine-like | G6 | P[1] | I2 | R2 | C2 | M2 | A3 | N2 | T6 | E2 | H3 | 2 |
| | RVA/Sheep-tc/ESP/OVH762/2002/G8P[14] | | G8 | P[14] | I2 | R2 | C2 | M2 | A11 | N2 | T6 | E2 | H3 | 1 |
| | RVA/Guanaco-wt/ARG/Chubut/1999/G8P[14] | | G8 | P[14] | I2 | R5 | C2 | M2 | A11 | N2 | T6 | E12 | H3 | 1 |
| | RVA/Antelope-wt/ZAF/RC-18/2008/G6P[14] | | G6 | P[14] | I2 | R2 | C2 | M2 | A11 | N2 | T6 | E2 | H3 | 1 |
| | RVA/Goat-tc/BGD/GO34/1999/G6P[1] | | G6 | P[1] | I2 | R2 | C2 | M2 | A11 | N2 | T6 | E2 | H3 | 1 |
| H | RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-9/1992/G1P7[5] | Vacina | G1 | P[5] | I2 | R2 | C2 | M1 | A3 | N2 | T6 | E2 | H3 | 1 |
| | RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-SC2-9/1992/G2P7[5] | | G2 | P[5] | I2 | R2 | C2 | M1 | A3 | N2 | T6 | E2 | H3 | 1 |
| | RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI78-8/1992/G3P7[5] | | G3 | P[5] | I2 | R2 | C2 | M2 | A3 | N2 | T6 | E2 | H3 | 1 |
| | RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-BrB-9/1996/G4P7[5] | | G4 | P[5] | I2 | R2 | C2 | M2 | A3 | N2 | T6 | E2 | H3 | 1 |
| | RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-4/1992/G6P1A[8] | | G6 | P[8] | I2 | R2 | C2 | M2 | A3 | N2 | T6 | E2 | H3 | 1 |
| | RVA/Vaccine/USA/Rotarix-RIX4414/1988/G1P1A[8]F | | G1 | P[8] | I1 | R1 | C1 | M1 | A1 | N1 | T1 | E1 | H1 | 0 |

Os genótipos *Wa-like* estão destacados em verde, enquanto os *DS-1-Like* estão em vermelho. *AU-1-Like* estão em laranja (75).

1.6 Imunologia

A infecção por rotavírus ou a vacinação induz uma imunidade inata (inespecífica) e adaptativa (específica) (77). Após a infecção por RV, o sistema imune inato é rapidamente desencadeado, o que fornece um potente estado antiviral pela supressão da replicação do RV na célula hospedeira (78).

Neste caso, o sistema imune inato é mediado por macrófagos e produz interferons do tipo I e do tipo III (IFNs) e outras citocinas em resposta ao vírus. A imunidade inata desempenha um papel crucial para a eficácia da imunidade adaptativa que estimula a resposta imuno celular designada com especificidade e memória (79) (80).

Após a entrada do vírus na célula hospedeira, a resposta imune inata é iniciada, o que envolve o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno por receptores de reconhecimento do célula, incluindo receptores *Toll-like* (*TLR3*, *TLR7*, e *TLR8*); receptores semelhantes a domínios de organização oligomerização de nucleotídeos; receptores do tipo 1 (RIG-I) induzidos pelo ácido retinóico; e receptores de proteína - 5 associada a diferenciação de melanoma (*MDA5*) do dsRNA viral (79).

O sinal de *RIG-1* e *MDA5* através da proteína do sensor antiviral mitocondrial desencadeia a ativação do fator de resposta ao *IFNs* 3 e 7 e subsequente IFN - α / β e IFN - γ . O rotavírus antagoniza as respostas antivirais celulares inibindo o acúmulo nuclear de *STAT1*, *STAT2* e *NF-KB* (80).

Os receptores *toll-like* pertencem a uma família padrão e desempenham um papel significativo na resposta imune inata contra a infecção por rotavírus, induzindo a sinalização por diferentes vias. Isto leva à produção de citocinas pró-inflamatórias ou *interferon* tipo 1. Na infecção por RV, os *TLR3*, *TLR7* e *TLR8* contribuem com na sinalização dos *IFNs* (81). No entanto, mais estudos são necessários para melhor compreensão do papel dos receptores TLRS na resposta imune inata contra a infecção por rotavírus (82).

Depois da primeira infecção por rotavírus, infecções subsequentes tendem a ser menos graves sendo que, depois da segunda infecção, quase todas as crianças ficam protegidas das gastroenterites graves (83) . Os mecanismos exatos de como a infecção por rotavírus confere uma proteção nas infecções subsequentes ainda não estão bem esclarecidos, supõe-se que estejam envolvidos anticorpos não neutralizantes, e resposta imunocelular mediada pelas células T citotóxicas. (84).

1.7 Patogênese

A patogenia das infecções por rotavírus ainda não está bem definida. O jejuno dos mamíferos representa o principal local da replicação (85). O vírus penetra e se multiplica nos enterócitos no topo das vilosidades que são destruídas e eliminadas para o lúmen intestinal onde são substituídas células imaturas que vêm das criptas ainda inaptas para a produção de dissacarídeos, comprometendo a absorção dos dissacarídeos e de outros nutrientes, bastante ativas na secreção de água e eletrólitos (86).

O acúmulo de dissacarídeos no lúmen intestinal, por conseguinte, precipita o quadro diarreico de natureza osmótica. A proteína de envelope VP4, uma vez sob clivagem por ação da tripsina pancreática, desdobra-se nos componentes antigênicos VP5 e VP8, sub-unidades proteicas associadas à virulência do rotavírus, uma vez que se desencadeia o processo de penetração viral na célula (87). Entre as proteínas não estruturais implicadas de forma transitória na replicação viral intracelular destaca-se a NSP4, cujo potencial enterotoxigênico desencadeia processo diarreico secretório da infecção pelo rotavírus (88).

Dependo da idade do hospedeiro, diversos mecanismos estão envolvidos na infecção pelo RVA tais como: a ação da toxina NSP4 induzindo a diarreia secretória; estimulação do sistema nervoso entérico (SNE) induzindo a diarreia secretória e aumenta a motilidade intestinal; a alteração no metabolismo das dissacaridases e outras proteínas de membrana dos enterócitos induzindo a diarreia osmótica e mal absorptiva e a morte dos enterócitos contribuindo para a ocorrência da diarreia osmótica e mal absorptiva (78) (86).

A doença diarreia pelos RVA ocorre com maior frequência em crianças menores de dois anos de idade, e acredita-se que várias infecções podem ocorrer ao longo da vida e que por causa da imunidade adquirida nestes episódios, as crianças com idade mais avançada e os adultos sofram com episódios menos graves ou assintomáticos (8).

A disseminação extra-intestinal de rotavírus é rara mas, pode ocorrer e, pode ser detectado no líquido cefalorraquidiano (LCR), onde pode causar inflamação local (89).

Estudos recentes reportam que a infecção por rotavírus pode se disseminar pelo organismo hospedeiro e resultar em uma infecção sistêmica (90).

O sistema nervoso entérico (SNE) por se localizar abaixo do epitélio das vilosidades, recebe os estímulos do epitélio danificado pela infecção por rotavírus. Relatos das manifestações neurológicas associadas à infecção por rotavírus vem sendo reportados, variando de convulsões benignas a encefalite letal. No entanto, ainda não está claro se o rotavírus permanece ativo e replicando nos sítios extraintestinais ou se é apenas transferido

passivamente pela corrente sanguínea (86). A patogenia da infecção pelo RVA é complexa mas do é actualmente conhecida(86).

1.8 Diagnóstico da infecção por rotavírus

Os sintomas clínicos não são específicos, sendo assim não podem diferenciar a infecção por rotavírus das infecções causadas por outros patógenos entéricos. Desse modo, vários métodos foram desenvolvidos para o diagnóstico da infecção causada por rotavírus (72).

Geralmente a infecção resulta em uma libertação massiva de partículas virais nas fezes, o que facilita a detecção do vírus (40). Inicialmente, a microscopia eletrônica (ME) foi a principal ferramenta utilizada para o diagnóstico, devido à grande quantidade de partículas virais e à morfologia característica do vírus (91).

Devido à baixa sensibilidade da ME, esta metodologia foi substituída na rotina pelo ensaios imuno-enzimáticos (EIA), que permitem a detecção de antígenos específicos de RVA. Os EIA têm boa sensibilidade e especificidade e são fáceis de executar (92).

Com a evolução da tecnologia, introduziu-se o diagnóstico molecular através da utilização das metodologias de reação em cadeia polimerase, (PCR) e da PCR quantitativa em tempo real, que são muito mais sensíveis e específicas que o EIA. Essas técnicas, além de serem usadas para a confirmação da infecção, podem permitir a detecção de rotavírus em indivíduos assintomáticos. Em algumas situações, o diagnóstico exige o sequenciamento dos nucleotídeos (nt): na análise filogenética das estirpes de RVA; no monitoramento das recombinações e rearranjos genéticos; na avaliação de falhas vacinais; ou na emergência de novas estirpes virais (72).

1.8 Vacinas contraa infecção pelo rotavírus

As vacinas são de fundamental importância para o controle de doenças infecciosas como a diarreia por rotavírus, especialmente entre populações que vivem em más condições sanitárias. Além disso, as vacinas podem gerar efeitos de rebanho, que resultam em proteção mesmo entre aqueles que não foram vacinados (93).

Como consequência do peso da infecção pelo rotavírus, que resultou em 453.000 mortes anuais em 2008 (94) e 215.000 casos em 2013, onde cerca de 95% dos casos são em países subdesenvolvidos da África e Ásia (95), a Organização Mundial da Saúde (OMS), encontra como solução o desenvolvimento de uma vacina eficaz para reduzir a gravidade da

infecção (96). Além disso, baseado no conhecimento no qual a infecção natural por rotavírus confere uma proteção subsequente, a vacina poderia evitar o agravamento da doença (97).

Em um breve histórico sobre a vacina contra o rotavírus, destacamos a vacina *Rotashild* (*RotaShield*, *Wyeth Laboratories, Inc., Marietta, Pennsylvania*) (*RRV-TV*), que foi a primeira vacina desenvolvida e licenciada em 1998. Ela resultou da recombinação das estirpes humanas G1, G2, G4 com estirpes de macaco *Rhesus*, G3P[3] (98). No entanto, no mesmo ano, foi retirada de circulação devido ao aparecimento de efeitos adversos (invaginação do intestino) (99).

Com a retirada da vacina (*Rotashild*), vários esforços foram empregados para desenvolvimento de uma vacina eficaz. Neste contexto, em 2006, duas candidatas vacinais, de aplicação oral, foram introduzidas: a *Rotarix* (*GSK, Biologicals Belgium*) e a *RotaTeq*TM (*Merck & Co, Inc, USA*) (100).

Os estudos acerca das duas vacinas comprovaram a segurança, proteção e tolerância contra infecções graves de rotavírus (101) (102). Atualmente, essas vacinas estão licenciadas em mais de 100 países (103) (104). Mas, destaca-se que em países em desenvolvimento a saber, África e Ásia, a proteção apresentou uma menor eficácia, devido a grande diversidade de estirpes e a circulação de estirpes como G8, G9 e G12 e a ocorrência de infecções mistas (105) (106).

A vacina *Rotarix* (*RV1*) (*GSK, Biologicals Belgium*), é uma vacina monovalente contendo estirpe humana vivo-atenuada G1P[8] e replica-se eficientemente no intestino humano (107). A vacina é administrada em duas doses, aos 2 e 4 meses de idade. Para avaliar a sua eficácia, vários estudos foram realizados em países desenvolvidos e em desenvolvimento tendo demonstrado uma redução de hospitalizações e do número dos casos de diarreia (de 59 a 90%) (108) (109) (110) (111) (112).

A vacina *RotaTeq*TM (*RV5*) (*Merck & Co, Inc, USA*) é uma vacina pentavalente bovina e humana direcionada aos genótipos G1, G2, G3, G4 e P [8], recombinante dos genótipo bovino G6P[5] (estirpe WC3), sendo administrada em três doses, aos 2, 4 e 6 meses (93).

Apesar de apresentar genótipos circulantes mais abrangentes, a vacina *RV5* tem apresentado baixa eficácia em comparação com a vacina *RV1* (95). Nos países da África e da Ásia, a baixa eficácia vacinal pode não estar relacionado com a própria vacina, mas sim a vários outros fatores tais como: altos níveis de anticorpos materno, desnutrição, baixas coberturas vacinais, diversidade de genótipos e idade em que a vacina é administrada (102) (113) (114). No entanto, não obstante desses desafios, a OMS continua a recomendar a

introdução da vacina em todos os programas nacionais de imunização (Burnett et al. 2017) (104).

1.8.1 Outras vacinas licenciadas

Para suprimir as lacunas existentes nas vacinas atuais e para melhorar a eficácia e o fornecimento global nos países em desenvolvimento da África e da Ásia (75), mais duas vacinas orais de vírus atenuado aguardam a sua pré-qualificação: a vacina pentavalente recombinante bovino-humana, *Rotasiil* (*Serum Institute of India*), administrada em três doses, e a vacina monovalente bovino humano bovina Rotavac (*Bharat Biotech*), direcionadas para a estirpe G9P[11] (aka 116E), também administrada em três doses (115) (116).

Além das vacinas descritas acima, outras vacinas orais de vírus vivo-atenuado foram licenciadas e disponibilizadas internamente na China (LLR, *Lanzhou Institute of Biological Produces*) e no Vietnã (*Rotavin, PolyVac*)(117) (Quadro 1.1).

Quadro 1.1. Descrição das vacinas licenciadas e em uso (110)

| Nome/tipo | Organização/compañia | Composição | Doses | Tipo VVM | Dose/Preço US, 2017) | Licenciada |
|------------------------------|--|---|-------|----------|----------------------|---------------------------------------|
| Rotarix | GSK Biologics | Estirpe de rotavirus humano atenuado G1P[8] | 2 | 14 | 2,50 | >100 países |
| Rotateq | Merck and Co | Recombinação de estirpe de rotavirus bovina-humana G1, G2, G3, G4, P1[8]. | 3 | nunhuma | 3,20 | >100 países |
| Rotasiil | Serum Institute of India, India and PATH, USA | Recombinação da vacina bovina humana G1,G2,G3,G4, G9. | 3 | 30 | 2,50 | Índia, sob pré qualificação pela OMS. |
| ROTAVAC | Bharat Biotech, India and PATH, USA | Estirpe atenuada de rotavirus neonatal G9P[11] (aka 116E) | 3 | 2 | 1,0 | Índia, sob pré qualificação pela OMS |
| Lanzhou Lamp rotavirus (LLR) | Lanzhou Institute of Biological Products China | Estirpe de rotavirus de carneiro G10P[12] | 5 | | N/A | china |

| | | | | | | |
|------------|---------------------|--|---|--|-----|---------|
| Rotavin-MI | POLYVAC, Vietnam | Estirpes de rotavirus atenuado humano G1P[8] | 2 | | N/A | Vietnam |
|------------|---------------------|--|---|--|-----|---------|

VVM- monitor do frasco vacina, OMS- Organização Mundial da Saúde. Fonte: Adaptado de Lunal (118) e Kirkwood (117).

1.8.2. Vacinas em fase de desenvolvimento

No mundo, várias outras candidatas vacinais continuam sendo desenvolvidas.

Na China, o *Institute Lanzhou* completou o ensaio clínico da fase III da vacina trivalente atenuada da recombinação de estirpes de carneiro e humana (LLR recombinante). Ainda na China, o *Institute of Biological Products* está no processo de completar a fase I da vacina hexavalente bovina-humana (117).

No Brasil, o Instituto Butantan finalizou o ensaio clínico de fase I para uma vacina pentavalente bovino-humana (118).

Na Austrália e na Indonésia, o *Murdoch Childre`s Research Institute* e *PT Biofarma* estão desenvolvendo a vacina oral de vírus “vivo-atenuado” a partir da estirpe G3P[6], considerada responsável por causar infecções assintomáticas em recém-nascidos. O quadro abaixo apresenta um resumo das vacinas em desenvolvimento.

Quadro 1.2. Vacinas de rotavírus em fase de desenvolvimento

| Fase desenvolvimento | Nome/tipo | Composição | Via de administração | Organização/companhia |
|----------------------|------------------|--|-------------------------------|--|
| Fase III | LLR recombinante | Recombinação de estirpes rotavirus de carneiro-humano G2,G3,G4 | Oral | <i>Lanzhou Institute of Biological Products, china</i> |
| Fase III | Rotashield | Recombinação da estirpe atenuada de rotaviurs de macaco-humano-tetravalente | Oral | <i>Institute Medica Fundation and PATH ,USA</i> |
| Fase III | UK recombinante | BRV Tetravalente G1-G4 | Oral | <i>Santha Biotech, India</i> |
| Fase IIb | RV3 | Estirpe de reotavirus neonatal atenuada | Oral | <i>Murdoch`s Research Institute. Australia e Biofarma Indonesia,</i> |
| Fase II | Subunidade | VP8 truncado da P[4], P[6],[P8] | intramuscular | <i>National Institute of Health e PATH USA</i> |
| Fase I recobminante | UK recombinante | Viva atenuada recombinante da estirpe rotavirus bovina-humana, tetra a hexavalente | oral | <i>Wuhan Institute of biological products, Chine and PATH, USA</i> |
| Pré Clínica | IRV | Inactivada G1P[8],G2P[4] | Intramuscular ou intradermica | <i>USA CDC</i> |

| | | | | |
|-------------|------------|---|----------------|---|
| Pré-clínica | Subunidade | Partículas semelhantes a vírus VP2/6/7; VP2/4/6/7 | Por determinar | <i>Baylor College of Medicine, USA</i> |
| Pré-clínica | subunidade | Tucacado VP8 da partícula P de norovírus | Por determinar | <i>Cincinnati Children's Hospital Med Cent, USA</i> |
| Pesquisa | subunidade | VP6 combinado com norovírus GI e GII VPLs | Por determinar | <i>University of Tampere School of Medicine, Finland.</i> |

Fonte: Adaptado de Lunal (118) e Kirkwood (117)

1.9 . Epidemiologia da infecção por rotavírus

O rotavírus é o principal agente etiológico causador de gastroenterite infantil grave em todo o mundo, sendo responsável por cerca de um terço dos episódios de diarreia que requerem hospitalização (119).

Os RV são ubíquos, interespecíes-transmissíveis e o acúmulo de mutações pontuais, recombinação e rearranjos genômicos são responsáveis pela grande heterogeneidade genética destes vírus. Consequentemente, estas características são associadas com a propagação de diferentes genótipos do RVA e variantes genéticas nas diferentes regiões do mundo (93) (110) (111) (112).

Nos países de clima temperado, a infecção por RVA apresenta uma distribuição sazonal característica, com picos epidêmicos anuais no inverno. Nos países de clima tropical e subtropical a infecção ocorre ao longo de todo ano (120).

O padrão de incidência na infância é muito semelhante nos diferentes continentes, entretanto os riscos de doença grave, internação hospitalar e mortalidade variam de acordo com as condições socioeconômicas e a qualidade de prestação de cuidados com a saúde (119).

No mundo, no ano 2016, ocorreram aproximadamente 258 milhões de episódios de diarreia por RVA em crianças menores de cinco anos, necessitando de cuidados domiciliares, onde: 25 milhões requereram visitas hospitalares, dois milhões necessitaram de hospitalização e 128.500 foram a óbito, dos quais 82% ocorreram na África Subsaariana. (121). (Figura 1.3)

A estimativa global da mortalidade por RVA reduziu de 528.000, em 2000, para 215.000, em 2013, e para 128,500, em 2015 (94). Nos países desenvolvidos, o número é limitado de óbitos, entretanto a taxa de morbidade continua elevada (119). Os países em desenvolvimento, principalmente da África e Ásia, são os que apresentam maiores taxas de mortalidade (94) (95).

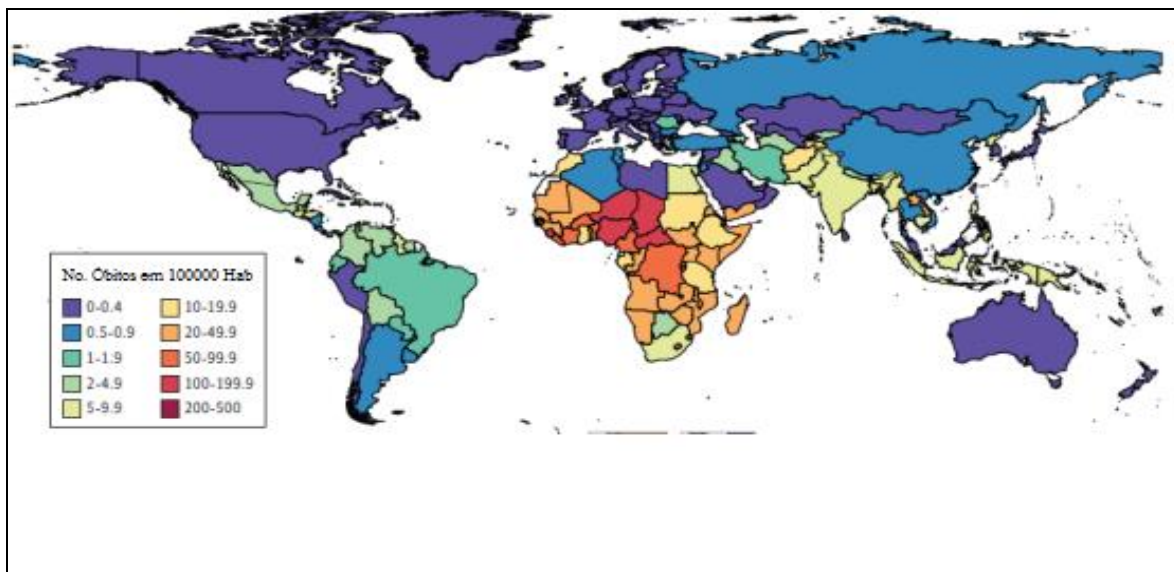


Figura 1.3 Distribuição geográfica da mortalidade associada ao Rotavírus da espécie A em crianças menores de cinco anos (116).

1.10 Distribuições dos genótipos

Vários estudos epidemiológicos sobre a infecção por RVA têm demonstrado uma grande diversidade genética das estirpes circulantes nos cinco continentes, principalmente nos países da África e Ásia (113) (110)(114)(115) (116).

Estudos epidemiológicos realizados nos cinco continentes reportam uma relativa constância nos principais genótipos circulantes. Dentre as possibilidades de combinações G-P, os cinco G prevalentes são: G1, G2, G3, G4 e G9, representando uma incidência global entre 80 e 95%. E para o genótipo P, os mais prevalentes são P[8], P[4] e P[6]. Estudos têm reportado maior frequência na associação dos genótipos G1, G2, G3, G4 e G9 com o genótipo P[8] e o G2 com o P[4] (122).

Além desses seis genótipos, outros podem ocorrer e com importância regional (123). A exemplo da circulação com maior frequência da estirpe P[6] na África (124).

No entanto, no mundo, vários estudos epidemiológicos relatam a detecção esporádica de genótipos G não comuns em casos humanos (G5-G6, G8, G10, G11 e G20) e genótipos P (P [1], P [3], P [5], P [7], P [9], P [11], P [14], P [19] e P [25]) e recentemente combinações como G26P[19] e G6P[14] (125)(126). Acredita-se que, muitos desses genótipos não comuns sejam de origem animal e tenham sido introduzidos em humanos através da transmissão interespecie ou eventos de recombinações genéticas (127).

Adicionalmente, foi comprovado que a prevalência de genótipos varia de estação para estação do ano em diferentes áreas geográficas (122) (128).

1.11 Distribuições dos genótipos na África

No continente Africano, os padrões de distribuição das combinações dos genótipos G-P circulantes são diferentes das observadas em outros continentes (Figura 1.4).

Estudos realizados em 20 países africanos, durante dez anos (2006-2016), demonstraram que as combinações mais comuns de G e P foram: G1P[8], G2P[4], G9P[8] e GP[6] (129).

Na figura 1.5 podemos observar os resultados de um estudo de vigilância epidemiológica realizado em 15 países da África Subsaariana, durante seis anos (2010-2015), que revelou que o período pré-vacina foi caracterizado por uma diversidade de combinação dos genótipos: G1P[8], G2P[4], G9P[8], G12P[8], G2P[6] e G3P[6]. No período pós-vacinal, não se verificou nenhuma alteração das combinações, apesar da ocorrência de combinações não comuns dos genótipos G e P: G1P[4], G2P [8], G9P[4] e G12P[4] (123).

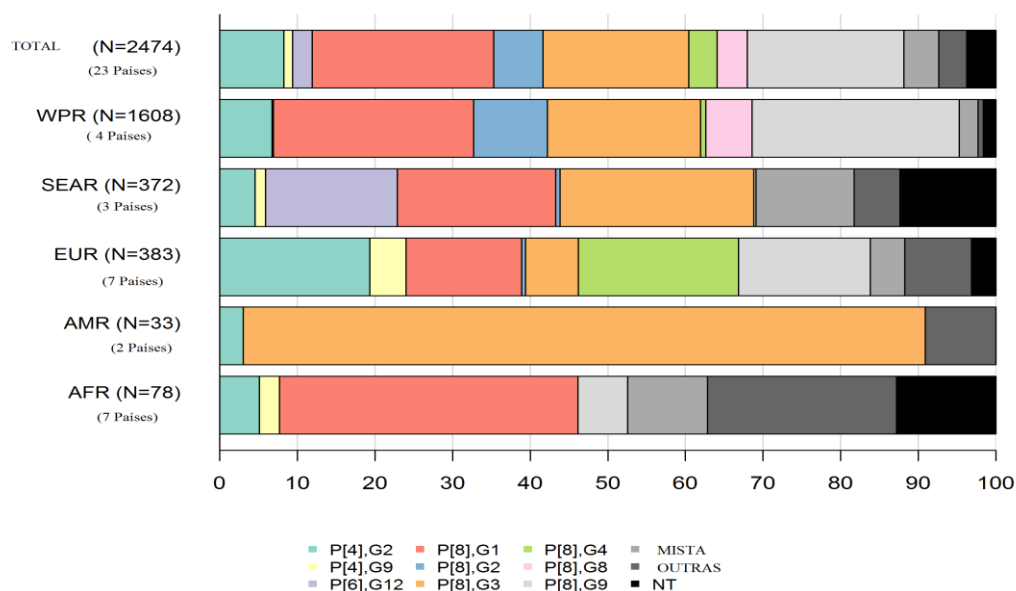


Figura 1.4. Distribuição dos genótipos de rotavírus A. Fonte: www.who.int/immunization/diseases/rotavirus/en/2019.

Na África Ocidental (República de Camarões), um estudo realizado no período pré-vacinal entre os anos de 1999-2013, reporta que a combinação G1P[8] foi mais frequente, seguida por G3P[6], G12P[8] e G2P[6]. Também foi possível detectar as combinações G1P[10], G3P[4], G4P[4], G5P[8], G6P[8], G8P[4], G8P[8], G9P[4], G9P[14], G10P[8] e G12P[4] (130).

Em República de Gana, as combinações dos genótipos mais observados no período pré-vacinal foram: G1P[8], G3P[6] e G2P[6], enquanto que no período pós-vacina as combinações G12P[8], G10P[6], G3P[6] e G1P[8] foram as mais observadas (131).

A combinação não comum G6P[14] foi detectada pela primeira vez durante a vigilância hospitalar no Gana (125). Nos últimos anos, essa e outras combinações incomuns do genótipo G6 (genótipo conhecido somente entre bovinos) têm sido descritas em humanos em outros países da África (132)

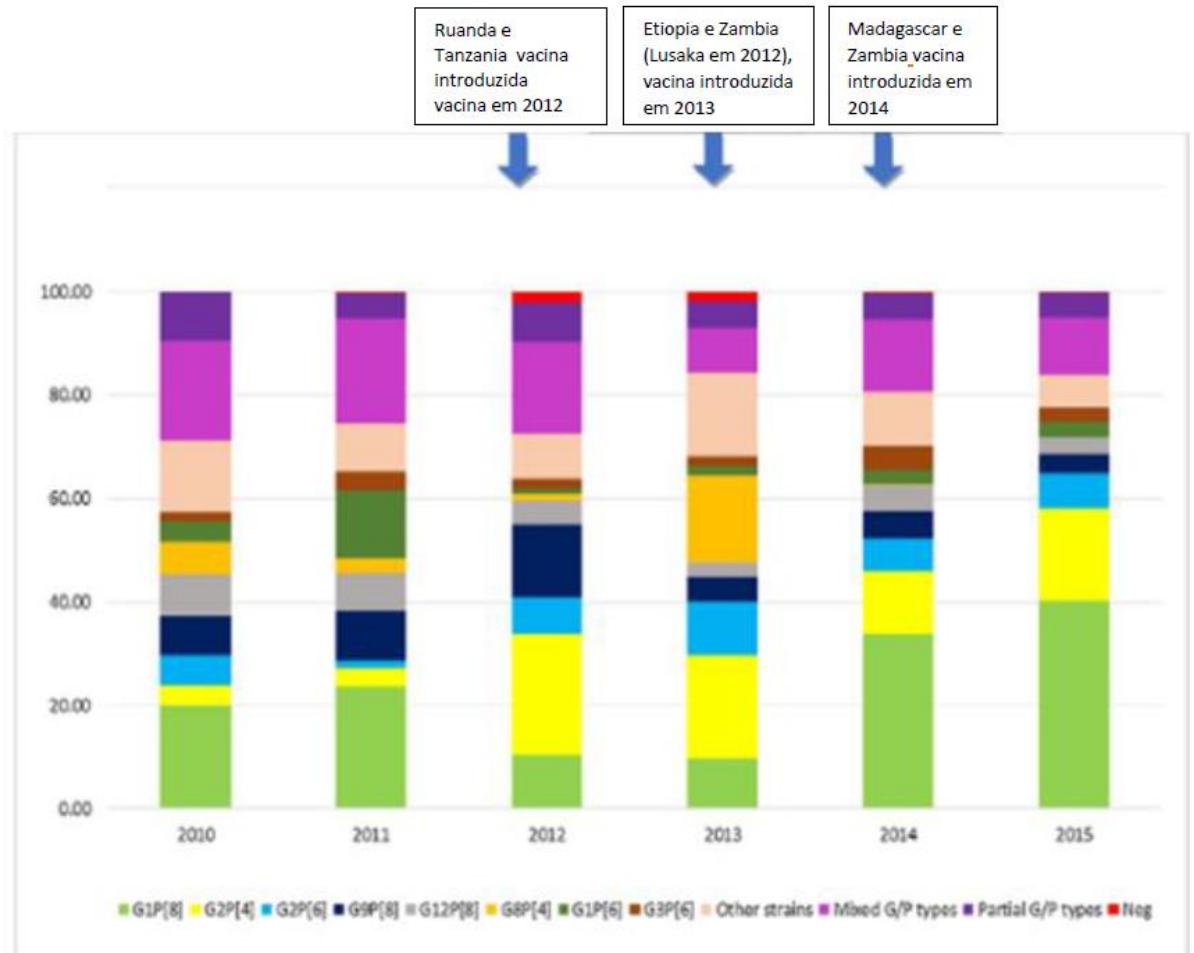


Figura 1.5. Distribuição temporal dos genótipos de rotavírus antes e depois da introdução da vacina na África Subsaariana (118).

1.12 Prevenção e controle

Ao contrário da diarreia por outra etiologia, medidas como a ampliação do acesso à água potável e ao saneamento básico têm impacto pouco expressivo na morbidade associada aos rotavírus, já que as taxas de incidência desta infecção nos países desenvolvidos são comparáveis às taxas dos países pobres sem recursos (133).

O tratamento de rotina para episódios de doenças diarreicas, incluindo a TRO, pode reduzir a desidratação causada por infecções por RVA em casos graves, no entanto, a perda de fluido é extensa e pode ser necessário reidratação intravenosa (134).

Outro método que tem sido estudado sobre o tratamento de rotavírus, é uso de probióticos que são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro (135). Têm se mostrado promissor na prevenção mas, requerem novos estudos e uma análise de custo-benefício antes de qualquer recomendação para o uso na comunidade (136).

A amamentação é recomendada e deve ser promovida mas, os seus efeitos são limitados para a prevenção (137). Sendo assim, o controle efetivo da diarreia por rotavírus, está condicionada a uma vacina eficaz e de uso corrente ao longo do primeiro semestre de vida (138).

Por outro lado, sabe-se que a imunidade natural após uma primeira infecção por RVA não é totalmente protetora. É possível nova infecção por outros genótipos/estirpes virais, embora os contatos subsequentes com o vírus levem a manifestações clínicas menos graves, podendo ser assintomáticas (139).

Nos últimos dois anos, duas vacinas foram licenciadas: RotaTeq[®] (Merck, North Wales, PE, EUA) e Rotarix[®] (GlaxoSmithKline [GSK], Rixensart, Bélgica). São vacinas orais, sendo a primeira pentavalente (G1, G2, G3, G4 e P[8]) de vírus reestruturado (humano – bovino WC3); e a segunda, monovalente (G1P[8]), atenuada e de origem humana (140)

Embora a composição das duas vacinas seja diferente, elas têm apresentado mesma eficácia e, em grande parte, o mecanismo de ação é semelhante, sendo que as duas vacinas se mostram protetoras contra os genótipos mais comuns (G1-G4, G9) de RVA que circulam no mundo (100)(141).

Na África, apesar das vacinas já licenciadas contra a infecção pelo RVA apresentarem menor eficácia, como demonstrado recentemente no Malawi por Mandhi e colaboradores em 2012, seu uso seria de grande importância para evitar e reduzir o número de casos graves e de mortes (142).

A fim de se reduzir a gravidade da infecção do rotavírus, Moçambique introduziu em setembro de 2015, no seu Programa Alargado de Vacinação (PAV), a vacina monovalente Rotarix (RIX4414 RotarixMT) (81).

1.13. Justificativa

A diarreia continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em crianças menores de 5 anos a nível mundial. Os episódios repetidos de diarreia são uma das causas subjacentes mais importantes de malnutrição calórico-proteica grave e de morte.

Em Moçambique no estudo multicentrico GEMS, a doença diarreica foi reportada como sendo um dos principais problemas de saúde pública entre crianças menores de cinco anos, e o rotavírus foi um dos principais agentes da etiologia da doença diarreica (5).

Recentemente um estudo realizado no distrito da Manhica, indica que a doença diarreica continua a ser um dos principais problemas de saúde pública (6).

A morbidade associada à diarreia é muito importante; crianças são acometidas anualmente por cerca de 1 a 10 episódios de diarreia (143) (144).

Em Moçambique, bem assim como em outros países do mundo a sua importância está relacionada ao impacto da doença na população, traduzido pelos seus danos à saúde, afectando o desenvolvimento infantil, bem como à sociedade pelos custos gerados pela demanda aos serviços médicos, atendimento ambulatorio, urgências, hospitalizações (custos directos) e as perdas de dias de trabalhos, de escola, gastos com medicamentos, transportes, etc. (custos indirectos)(143).

Adicionalmente, o conhecimento da interacção de diarreia persistente e malnutrição como causa de mortalidade tem reforçado a necessidade de desenvolvimento de programas de intervenção além do tratamento baseado em terapia de re-hidratação oral que acarreta elevados custos para o País.

Devido ao elevado índice de morbi-mortalidade associada à diarreia por rotavírus no mundo, ficou evidente a necessidade de medidas urgentes como o desenvolvimento de vacinas contra esse vírus, cujo objectivo principal é a atenuação da gravidade da doença diarreica(94).

Na África, Moçambique é um dos 32 países que introduziram a vacina contra o rotavírus no seu programa nacional de vacinação como medida preventiva para redução dos casos de morbidade e mortalidade da doença diarreica por rotavírus em crianças menores de cinco anos(121).

Estudos tem demonstrado que o período antes da introdução da vacina Rotarix foi caracterizado pela ocorrência de uma grande diversidade de génotipos, sendo o génotipo G1P[8] o mais predominante. No período pós-vacinal, observou-se a redução do génotipo G1P[8] e aparecimento de génotipos emergentes (131)(145)

Em Moçambique, no distrito de Chókwè, Langa e colaboradores observaram uma grande diversidade das estirpes de RVA onde as combinações mais isoladas foram G12P[8] e G12P[6], genótipos diferentes daqueles contidos nas vacinas em uso (97). Por outro lado, análise similar realizada em Malawi, antes da introdução da vacina, mostrou que a estirpe RVA mais prevalente foi a mesma globalmente identificada G1P[8], mas também foi identificada uma estirpe emergente (G12P[6]), que não compartilha nem G nem P com qualquer das duas vacinas atuais (RotaTeq ou Rotarix). Teoricamente, este dado pode, de algum modo, influenciar a eficácia da vacina (146).

Na África Subsaariana, a eficácia vacinal atingiu 68%, entretanto essa proteção pode ser reduzida devido ao aparecimento de estirpes não comuns, estirpes emergentes e constelações genóticas, caso essas vacinas não produzam proteção cruzada (147) (123).

Na região sul de Moçambique, estudos tem reportado uma alta prevalência de rotavírus em crianças com diarreia aguda (25 a 42%) (148)(149)(150). O elevado número de hospitalizações verificado no Hospital Central de Maputo (HCM), torna relevante a concentração de esforços no acompanhamento da doença diarreica grave neste local.

Estes estudos são importantes para: monitorar o impacto da vacinação na redução da morbidade e mortalidade da doença; avaliar a eficácia da vacina e identificar as possíveis falhas vacinais; monitorar o aparecimento de estirpes emergentes que podem escapar da vacinação; identificar grupos populacionais que podem não ser adequadamente cobertos pela vacinação; continuar a monitorar a segurança da vacinas; e confirmar com o diagnóstico laboratorial para rotavírus de todos os casos de diarreia em amostras de fezes de crianças até os cinco anos. Além disso, acompanhar a evolução clínica da doença diarreica grave, antes e depois da introdução da vacina.

A compreensão da real prevalência dos vírus e do mecanismo associado a emergência de novas variantes virais e como elas se disseminam dentro da população de risco, irá melhorar as medidas preventivas contra as doenças diarreicas em Moçambique.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAL

- Avaliar o impacto da vacina contra o RVA na prevenção da infecção e na diversidade dos genótipos, após a introdução da vacina *Rotarix*® (RV1) em Moçambique de 2013 a 2018.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar os casos de atendimentos por diarreia aguda em crianças menores de cinco anos no Hospital Central de Maputo, no período pré vacinal e pós vacinal.
- Estimar a prevalência dos rotavírus, antes e após a introdução da vacina, em crianças hospitalizadas com diarreia aguda na pediatria do Hospital Central de Maputo;
- Avaliar as características clínicas e demográficas das crianças atendidas no HCM com diarreia aguda, no período de 2013 a 2018;
- Avaliar a diversidade genética das estirpes dos RVA, antes e depois da introdução da vacina RV1;
- Avaliar a dinâmica da evolução do vírus e analisar possível ocorrência de eventos de reestruturação genômica (*reassortment* e mutações).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo e local de estudo

Foi realizado um estudo descritivo transversal de base hospitalar. O estudo foi realizado na cidade de Maputo, nos serviços de pediatria do Hospital Central de Maputo (HCM). O HCM, como unidade sanitária de referência nacional, atende rotineiramente às crianças de todas as províncias e distritos vizinhos, com demanda espontânea e referenciada. O setor de pediatria do HCM tem a capacidade para internar aproximadamente 600 pacientes.

3.2 Área de estudo

O estudo foi realizado na cidade de Maputo. O município tem uma área de cerca de 300 quilômetros quadrados e uma população de 1.101.170, segundo dados preliminares do censo de 2017. A sua área metropolitana, que inclui o município da Matola e os distritos de Boane e Marracuene, tem uma população de 3.158.465 habitantes. A figura abaixo apresenta o mapa legenda da área de estudo.

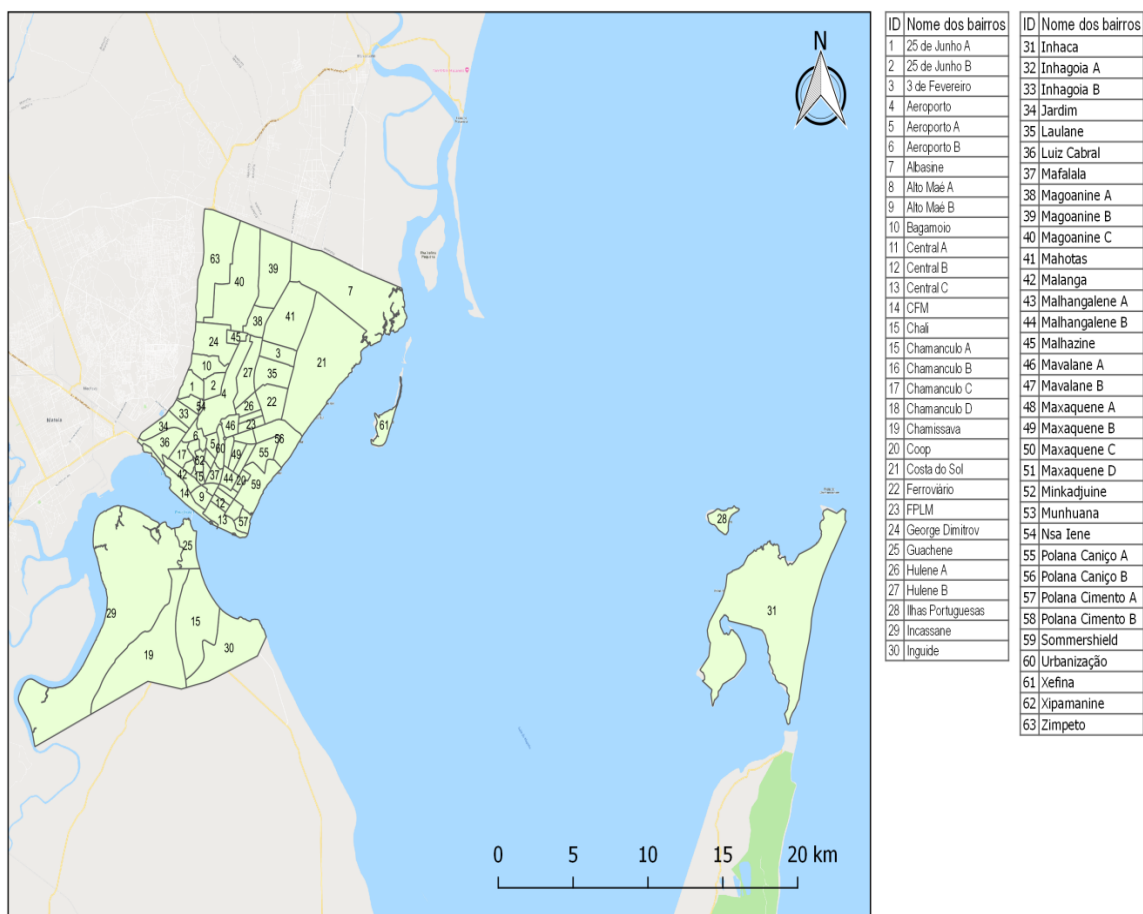


Figura 3.1. Mapa legenda da descrição da área de estudo: Elaborado por: Dinis e Jerónimo Langa 2019.

3.3 Período do estudo

A coleta de amostras foi realizada no período compreendido entre os anos 2013 a 2018. De 2013 a 2015, período pré-vacinal, as amostras foram colhidas na pediatria do HCM. Em setembro de 2015, o HCM passou a ter um Posto Sentinela da Vigilância Nacional de Diarreias Agudas, onde foram captadas as amostras após introdução da vacina.

3.4 Populações de estudo

A população do estudo foi composta por crianças menores de cinco anos de idade, assistidas nos balcões de triagem e atendidas no setor de pediatria do HCM, durante o período de estudo, com diarreia de etiologia presume-se que reuniam os critérios de inclusão no estudo.

3.5 Planos de amostragem

Foi realizada uma amostragem por conveniência. Onde pretendia-se ter um tamanho amostral adequado, correspondente a real população nos períodos pré e pós introdução da vacina, com um erro máximo de 5% e intervalo de confiança (IC) de 95%. Para efeito de inclusão, foram selecionadas todas as crianças hospitalizadas com diarreia, e com idade inferior a cinco anos, internadas na pediatria de HCM no período de 2013 a 2018 que tiveram sua participação concedida por seus responsáveis legais de forma voluntária com assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

3.6 Tamanho amostral

Para o presente estudo foi calculado o tamanho amostral (n) de 680 amostras, calculado para antes e depois da introdução da vacina, segundo a fórmula $N=PQZ^2/d^2$ onde: N - tamanho da amostra, p - probabilidade de casos positivos, q - probabilidade de casos negativos, d - precisão absoluta, Z- Valor correspondente ao intervalo de confiança com margem de erro de 5%. Sendo que, para o período anterior a introdução da vacina, foi considerada a probabilidade de ocorrência de 50% (isto é, não havendo informação da prevalência da infecção do RVA no local), onde foram coletadas 803 amostras. Essas amostras foram utilizadas para a determinação dos genótipos correspondentes ao período pré-vacinal. Após a vacinação, prevalência considerada foi de 25%, totalizando um tamanho amostral de 288 amostras.

3.7 Seleção dos Participantes

3.7.1 Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo as crianças com as seguintes características:

- Crianças menores de cinco anos;
- Internadas nos serviços de pediatria de Hospital Central de Maputo;
- Presença de diarreia como doença primária
- Definição de caso: presença de diarreia aguda manifestada por três ou mais evacuações/dia, ou número inferior a três, desde que as fezes fossem líquidas ou muito abundantes;
- Diarreia a menos de sete dias;

3.7.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo as crianças com as seguintes características:

- Apresentarem parada cardiorrespiratória à admissão.
- Com diarreia mas que não forneceram amostra de fezes
- Tenha iniciado a diarreia durante o internamento na unidade sanitária

3.8 Considerações Éticas

O presente estudo foi submetido à Unidade de Pesquisa Clínica do Instituto Nacional de Saúde Moçambique (UPC-INS) e pelo Comitê Institucional de Bioética para Saúde do INS (CIBS-INS). Como nos referimos anteriormente, este estudo foi realizado em dois períodos: pré-vacinal (2013 a 2015) e pós-vacinal (2016 a 2018).

Para avaliação do primeiro período, foram usadas amostras colhidas no âmbito do estudo realizado na pediatria do HCM sob o título “Ocorrência de RVA em crianças menores de cinco anos internadas com diarreia no HCM”, cujo protocolo teve aprovação do CNBS com número de referência 317/CNBS/12, onde a participação no estudo foi livre e voluntária, os cuidadores que aceitaram fornecer amostras assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) informando que as amostras seriam testadas por EIA. Havendo necessidade de se realizar testes adicionais (PCR e Sequenciamento), para melhor se avaliar o impacto do RVA, foi previamente solicitada a aprovação de adendo do protocolo ao CNBS (aprovações em anexo).

No segundo período, realizado a partir de setembro de 2015, os instrumentos de recolhimento de informação e o termo de consentimento utilizados foram uniformizados com

os da Vigilância Nacional de Diarreia (ViNaDia) também iniciada nesse ano na unidade sanitária.

1.9 . Coleta de dados clínico-epidemiológicos e das amostras fecais

Os pacientes foram atendidos pelos técnicos de saúde da unidade sanitária anteriormente mencionada e encaminhados para seleção pelo pesquisador, ou auxiliar de pesquisa, de segunda-feira a sexta-feira, das 07:30 às 17:00 horas. Os pais ou responsáveis foram informados sobre o estudo e após concordarem em participar do mesmo, assinaram o TCLE. Em seguida, foi aplicado o formulário padronizado, elaborado conforme as variáveis do estudo, seguido da coleta de amostra de fezes frescas das crianças. A colheita de fezes foi realizada com auxílio de uma espátula a partir das fraldas das crianças participantes. Posteriormente, o material fecal foi acondicionado em reservatório plástico impermeável, devidamente identificado e armazenado em geladeira ou caixa térmica à temperatura de 4°C (máximo 48h) em seguida todas as amostras coletadas foram submetidas ao diagnóstico sorológico de RVA pela técnica de ELISA. As amostras positivas a ELISA e com material suficiente foram submetidas a caracterização molecular por RT-PCR no laboratório do Instituto Nacional de Saúde em Moçambique e, posteriormente, armazenados à temperatura de - 80°C. Ao término da coleta do número total, as amostras foram enviadas para o Brasil para o Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental da Fundação Oswaldo Cruz, para o processamento das análises complementares (sequenciamento). Este procedimento foi realizado por uma empresa especializada, seguindo todas as normas internacionais de transporte de amostras dos dois países.

3.10 Processamento das amostras fecais

Foram preparadas suspensões fecais a 10% em tampão Tris-HCl Ca²⁺ 0,01M pH 7,2, em cabine de segurança biológica NB2, Holten Lamin Air MS 2010 Modelo 0.9. As suspensões foram homogeneizadas, clarificadas a 3000 x g por 10 min a 4°C e os sobrenadantes, conservados a -20°C.

3.11 . Detecção de antígenos virais.

Para triagem, foi realizado teste imunoenzimático usando o kit comercial IDEIA™ Rotavírus (Oxoid (Ely) (*Limited Thermo Fisher Scientific, Cambridgeshire, United Kingdom*)), seguindo as instruções do fabricante, com uma correlação de 99,5% e 99,0 %

com a com Microscopia Eletrônica e testes comerciais de EIA e, com uma sensibilidade e especificidade 100% e 99,2% respectivamente. Este método tem por princípio a detecção de antígenos da proteína VP6 dos RVA.

3.12 Extração de dsRNA viral

A extração de RNA viral foi realizada em todas as amostras positivas no EIA, a partir de sobrenadantes homogeneizados e clarificados de suspensões fecais pelo método descrito por Boom e colaboradores (151).

Em tubos de poliestireno tipo *Eppendorf*TM de 1,5mL, foram adicionados 1 mL de tampão L6 (Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 6,4, isotiocianato de guanidina, EDTA 0,2) e 400µL de suspensão fecal a 10%, seguido de 15µL de sílica. Após agitação orbital por 20 minutos, as suspensões foram centrifugadas a 16.000 x g por 60 segundos, descartando-se o sobrenadante em solução de NaOH 10N. Em cada tubo, foi adicionado 1mL de tampão L2 (Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4; tiocianato de guanidina 4 mM) seguido de agitação em vórtex para nova suspensão do sedimento formado. Nova centrifugação foi realizada a 16.000 x g por 60 segundos e o sobrenadante foi descartado em solução de NaOH 10N. A seguir, foram realizadas duas etapas de lavagens: na primeira, adicionou-se 1 mL de etanol a 70% a 4°C e, na segunda, 1 mL de acetona P.A (Merck) a mesma temperatura, utilizando-se os mesmos procedimentos de homogeneização e sedimentação anteriormente descritos, desprezando-se o sobrenadante em solução de hipoclorito de sódio a 5%. Após a última lavagem, os tubos foram incubados a 56° C por 15 minutos com as tampas abertas, para completa evaporação da acetona. Após esse período, foram adicionados 60µL de água livre de endo e exonucleases (Invitrogen) em cada tubo.

Os tubos foram novamente homogeneizados em vórtex por 10 segundos, incubados a 56° C por 15 minutos com as tampas fechadas. Após a centrifugação, a 16.000 x g por 3 minutos, 50µL do sobrenadante contendo o RNA foram colhidos cuidadosamente, transferidos para outro tubo e armazenados a -70°C.

3.13. Metodologias moleculares para genotipagem de rotavírus da espécie A

Foram seguidas as orientações descritas pela OMS no "Manual of Rotavírus Detection and Characterization Methods", que está disponível no site: [http://www.who.int/immunization/en/\(WHO 2009\)](http://www.who.int/immunization/en/(WHO 2009)).

3.13.1 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA, a partir do RNA extraído, foi realizada utilizando-se o iniciador randômico contido no *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*[®] (Applied Biosystems, USA), seguida de amplificação com iniciadores específicos.

Para a desnaturação da fita dupla de RNA, foram adicionados 2 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) em 10 µL de RNA extraído e incubado a 97°C por 7 minutos. Após esse procedimento, os tubos foram incubados por 2 minutos em banho de gelo e foram adicionados 38µL da mistura de reagentes do kit. Utilizando o termociclador, os tubos foram submetidos a temperatura de 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas e 85°C por 5 minutos. O produto foi estocado a 4°C até o momento da PCR.

Quadro 3.1 Mistura de reagentes utilizados na reação de transcrição reversa

| Reagente | Concentração | Volume/Reação |
|--|--------------|---------------|
| H ₂ O livre de DNAase / RNAase (Invitrogen [®]) | - | 14,8µL |
| Tampão RT Buffer (Applied Biosystems [®]) | 10X | 8,0 µL |
| 25X dNTP Mix (Applied Biosystems [®]) | (100mM) | 3,2 µL |
| RT Iniciadores Randômicos (Applied Biosystems [®]) | 10X | 8,0 µL |
| RT Multiscribe (Applied Biosystems [®]) | 50U/µL | 4,0 µL |

3.13.2. Reação de PCR e genotipagem

Para amplificação do gene que codifica para a proteína VP4 (876bp), foram usados os iniciadores pareados Con2/Con3 para a banda consensual, seguido de uma tipificação com coquetel de iniciadores específicos: Con3, 1T-1D, 2T-1, 3T-1, 4T-1, 5T-1, mP11 e p4943 do Rotavírus Humano (HRV) P[8], P[4], P[6], P[9],P[10],P[11] e P[14].

As sequencias de iniciadores e utilizados para a caracterização molecular dos genes VP4 (P) e VP7 (G) estão descritas nos quadros abaixo.

Quadro 3.2. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação e caracterização do gene VP4(P) de rotavirus da espécie A.

| Iniciador | Sequência | Posição | Genótipo | Tamanho segmento(Pb) | Referência |
|--|----------------------------------|------------|------------|----------------------|----------------------|
| Primeira amplificação consenso | | | | | |
| con3 | TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A | 11-32 | consenso | 876pb | Gentsch et al.(1992) |
| con2 | ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC | 868-887 | consenso | 876 | Gentsch et al.(1992) |
| VP4F | TAT GCT CCA GTN AAT TGG | nt 132-149 | consenso | 663 | |
| VP4R | ATT GCA TTT CTT TCC ATA ATG | nt 775-795 | consenso | 663 | |
| Segunda amplificação (incluir con3) | | | | | |
| 1T-1 | TCT ACT TGG ATA ACG TGC | 339-536 | KU/(P[8]) | 345Ppb | Gentsch et al.(1992) |
| 2T-1 | CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC | 474-494 | RV5/(P[4]) | 483pb | Gentsch et al.(1992) |
| 3T-1 | TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA | 259-278 | 1076(P[6]) | 267pb | Gentsch et al.(1992) |
| 4T-1 | TGA GAC ATG CAA TTG GAC | 385-402 | K8/(P[9]) | 391pb | Gentsch et al.(1992) |
| 5T-1 | ATC ATA GTT AGT AGT CGG | 575-594 | 69M(P[10]) | 583Pb | Gentsch et al.(1992) |
| mp11 | GTA AAC ATC CAG AAT GTG | nt 305-323 | | 312pb | Gentsch et al.(1992) |
| p4943 | GGTGTAGTTCCTGCGTA | nt 538-554 | | 546pb | Gentsch et al.(1992) |

Para a amplificação do gene que codifica para a proteína VP7 (1062bp), foram usados iniciadores pareados Beg9/End9 seguido de uma tipificação do genótipo G usando um coquetel dos iniciadores: End9 ou RVG9, aBT1, aCT2, aET3, aDT4, aAT8,mG9,mG10 e G12b específicos para rotavirus humano (HRV) G1, G2, G3, G4, G8, G9, G10, G12, (WHO 2009). Segundo a tabela abaixo

Quadro 3.3. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação e caracterização do gene VP7 de rotavirus da espécie A.

| Primer | Sequência | Posição | Genótipo | Tamanho segmento(Pb) | Referência |
|---|--|-------------------|----------------|----------------------|---------------------|
| Primeira amplificação | | | | | |
| Beg9 | GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G | 1-28 | consenso | 1062pb | Gouvea et al (1990) |
| End9 | GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG | 1062- 1036 | consenso | 1062pb | Gouvea et al (1990) |
| RVG9 | GGTCACATCATAACAATTCT | 1062- 1044 | consenso | 1062pb | Gouvea et al (1990) |
| sBeg9 | GGCTTTAAAAGAGAGAATTTTC | 1-21 | consenso | 1062pb | Gouvea et al (1990) |
| VP7F | ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC | nt 51-71 | consenso | 881bp | |
| VP7R | AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC | nt 914- 932 | consenso | 881bp | |
| Segunda amplificação (incluir um iniciador consenso) | | | | | |
| aBT1 | CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G | 314-435 | Wa (G1) | 749pb | Gouvea et al (1990) |
| aCT2 | CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G | 411-435 | DS1(G2) | 652pb | Gouvea et al (1990) |
| aDT4 | CGT TTC TGG TGA GGA GTT G | 480-498 | ST3(G4) | 652pb | Gouvea et al (1990) |
| aET3 | CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG | 689-709 | P (G3) | 374pb | Gouvea et al (1990) |
| mG9 | CTT GAT GTG ACT AYA AAT AC | | nt 757- 776 | 305bp | Gouvea et al (1990) |
| DT6 | CTA GTT CCT GTG TAG AAT C | 499-481 | Bo/UK(G6) | 500pb | Gouvea et al (1990) |
| aAT8v | GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG | nt 178- 198 | | 885bp | Gouvea et al (1990) |
| mG10 | ATG TCA GAC TAC ARA TAC TGG | nt 666- 687 | | 396bp | Gouvea et al (1990) |
| G12b | CCG ATG GACGTAACGTTGTA | nt 548 - nt567 | | 558bp | Gouvea et al (1990) |

A mistura de reagentes utilizada para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7 está descrita no Quadro 2. Controles negativos (água livre de ácidos nucleicos) foram utilizados durante todos os procedimentos desde a extração de ácidos nucleicos.

Quadro 3.4 Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7.

| Reagentes | Concentração | |
|---|--------------|----------|
| | inicial | Volume |
| H ₂ O livre de DNAase/RNAase (Invitrogen®) | - | 31,25 µL |
| Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen®) | 10x | 5 µL |
| dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen®) | 2,5mM | 4 µL |
| MgCl ₂ (Invitrogen®) | 50mM | 2,5 µL |
| Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen®) | 5U/mL | 0,25 µL |

3.13.3 Análise dos amplicons por eletroforese em gel de agarose a 1,5%

Para análise dos amplicons obtidos nos itens anteriores, 2µL de corante azul de bromofenol (Invitrogen®) foram adicionados a 10µL dos produtos da RT-PCR e os mesmos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (GIBCO-BRL®) a 1,5% em tampão TBE 0,5% (GIBCO-BRL®) por 1 hora a 100 Volts. Após a impregnação de 20 minutos com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), os amplicons foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Labnet®) e as imagens registradas em sistema de captura de imagem (BioImaging Systems®) utilizando o programa Labworks 4.0.

Controles negativos (água livre de ácidos nucleicos) foram utilizados durante todos os procedimentos desde a extração de RNA.

3.14. Purificação dos produtos da RT-PCR

Após a visualização do produto amplificado por eletroforese, o DNA foi purificado, visando o sequenciamento de nucleotídeos. Utilizou-se o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) baseando-se na inexistência de ampliações secundárias observadas ao gel de agarose e seguindo orientações do fabricante. Em resumo: Adicionou-se para cada produto da reação da PCR (amostra) a ser purificado igual volume de tampão *Membrane Binding Solution* já diluído conforme especificado pelo fabricante. Transferiu-se em seguida a mistura obtida para colunas/filtro acopladas a tubo coletor de 2 mL previamente identificados, incubou-se por 60 segundos e centrifugou-se por 60 segundos a 14000 rpm. Descartado o resíduo do tubo coletor, adicionou-se 700µl do tampão *Membrane Wash Solution*, seguindo-se para centrifugação por 60 segundos a 14000 rpm para lavagem da amostra. Com a finalidade de aperfeiçoar a lavagem, adicionou-se 500 µL do tampão *Membrane Wash Solution*, centrifugou-se por 5 minutos a 14000 rpm. Uma nova centrifugação à 14000 rpm por 60 segundos foi necessária para secagem da coluna. Em seguida, já no tubo de 1,5 mL acoplado a coluna/filtro previamente identificados, adicionou-se 20-50 µl de água livre de nucleases no centro da membrana para a eluição do de DNA.

Posteriormente, incubou-se e centrifugou-se por 60 segundos a 14000rpm. Após o termino armazenou-se o produto final à – 20°C.

3.15. Sequenciamento dos genes amplificados VP4 e VP7.

O sequenciamento foi realizado pela Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/Fiocruz. Segundo orientação da plataforma, de 100 a 250 pico moles de DNA purificado e 3,2 picomoles dos iniciadores utilizados na PCR foram adicionados em tubos de 1,5 mL. A reação foi realizada utilizando o *Big Dye Terminator® v 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®, CA, USA), conforme recomendações do fabricante.

Os cromatogramas das sequências foram obtidos a partir do sequenciador automático de 48 capilares “ABI Prism 3730 Genetic Analyze®r” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) do serviço da Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ.

Os iniciadores utilizados no sequenciamento foram os mesmos das reações de amplificação, porém individualmente.

Quadro 3.5. Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento dos genes, VP4 e VP7 de rotavírus da espécie A.

| Primer | Sequência | Posição | Genótipo | Tamanho segmento(Pb) | Referência |
|----------------------------------|--------------------------------|---------|----------|----------------------|---------------------------------------|
| Amplificação consenso VP4 | | | | | |
| 4con3 | TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A | 11-32 | consenso | 876pb | Gentsch et al. (1992) |
| 4con2 | ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC | 868-887 | consenso | 876pb | Gentsch et al.(1992) |
| Amplificação VP7 | | | | | |
| 9Con1L | TAG CTC CTT TTA ATG TAT GGT AT | 37-59 | consenso | 896Pb | Das et al. (1994)Gomara et al.(2001) |
| VP7R Deg | AAC TTG CCA CCA TYT YTT CC | 914-33 | consenso | 896pb | Gomara MI et al.(2001) |

3.16 Análise das sequências

As sequências obtidas foram alinhadas e editadas no *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.2.1. As amostras de referência e protótipos utilizadas neste estudo foram obtidas a partir do GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) através da ferramenta “Blast”.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no GenBank com o objetivo de definir os dendogramas correspondentes. Para as análises filogenéticas, foi utilizado o programa MEGA versão 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (152) e foram incluídas sequências nucleotídicas do GenBank que apresentaram similaridade maior que 99-98%, de acordo com a ferramenta do pacote Blast. As distâncias calculadas entre as sequências foram analisadas utilizando-se o algoritmo de Neighbor-Joining. A re-amostragem (bootstrap) aplicada foi de 2.000 repetições.

3.16 Análise de dados

As informações obtidas a partir do questionário foram cuidadosamente revisadas a fim de se detectar possíveis inconsistências e informações incompletas antes da entrada de dados.

Todos os dados foram devidamente codificados, sem identificação do nome paciente e da (o) mãe/cuidador (a). Para entrada de dados, foi criada uma base de dados no Excel versão 10, que posteriormente foi exportada para o pacote estatístico SPSS V20, para análise.

Para garantir a qualidade dos dados foi feita dupla entrada por digitadores devidamente treinados seguida por uma validação, realizada pelo investigador principal do estudo.

As características demográficas das crianças observadas foram resumidas através da estatística descritiva em função dos principais objetivos do estudo. Foram calculadas frequências das variáveis e os resultados foram apresentados em tabelas e figuras. Para estabelecer a relação entre as características sócio-demográficas e a clínica das crianças, foi usado o teste qui quadrado (χ^2) com IC de 95% e valor de $P < 0,05$.

Foi descrita a tendência e o padrão de sazonalidade de RVA, antes e depois da introdução da vacina RV1. Também foram calculadas, de forma comparativa, as medianas dos casos de hospitalização por diarreia antes e depois da vacina RV1. De forma similar, foi calculada a proporção da redução de casos de hospitalização por diarreia e por infecção por RVA.

Os casos observados foram estratificados em grupos etários de 0-11, 12-23 e 24-59 meses e por períodos pré e pós-vacinal.

O teste *Wilcoxon- Mann Witney* foi aplicado para avaliar a diferença estatística das variáveis entre os períodos pré e pós-vacina. As análises foram realizadas nos pacotes estatísticos SPSS V.20 e R versão 3.5.2.

4. RESULTADOS

4.1 Características sociodemográficas das crianças menores de cinco anos com diarreia observadas no estudo

Durante o período do estudo foram atendidas com diarreia cerca de 14.286 crianças no departamento de pediatria do Hospital Central de Maputo (HCM). Onde, aproximadamente 9.848 (68,9%) foram observadas no período pré-vacina (2013-2015) e 4.438 (31,1%) no período pós-vacina (2016-2018). Um total 4.147 (29,0%) foram hospitalizadas, sendo 3.484 (84,0%) no período pré-vacina e 663 (16,0%) no período pós-vacinal veja a tabela abaixo.

Tabela 4.1. Frequência de crianças menores de cinco anos observados e internados com diarreia na pediatria do HCM antes e depois da introdução da vacina.

| | Pré Vacina(%) | Pós Vacina(%) | Total |
|-------------------------|------------------|------------------|--------|
| Observados | 9.848(68,9) | 4.438(31,1) | 14.286 |
| Internadas | 3.484(84,0) | 663(16,0) | 4.147 |
| Amostra Coletada | 802(80,3) | 196(19,6) | 998 |

4.2. Frequência dos casos de diarreia observados pré e pós-introdução da vacina RV1

De abril de 2013 a dezembro de 2018, das 4.147 crianças menores de 5 anos hospitalizadas com diarreia, 1.151 (27,7%) foram registradas no estudo e em 998 (86,7%) foram coletadas as amostras de fezes e testadas por EIA. Oitocentos e dois casos (80,4%) no período pré vacina e 196 (19,6%) do período pós vacina ($P < 0,001$). Do total dos casos incluídos (58,0%) 579 eram sexo masculino ($P=0,427$) e 848 (84,9%) eram menores de 12 meses ($P < 0,001$) (Tabela 4.2).

A tabela abaixo descreve as características clínicas das crianças com diarreia aguda hospitalizadas no HCM no período estudado. Neste grupo, as manifestações clínicas mais comuns foram vômito, febre e pregada cutânea e olhos encovados. Observou-se diferença estatística significativa ($p = 0,002$) em relação à tais variáveis e tempo de internação.

Tabela 4.2. Descrição das características clínicas e sociodemográficas das crianças hospitalizadas com diarreia aguda no HCM antes e depois da introdução da vacina, 2013 a 2018

| Faixa etária (meses) | Total (%) | Período | | P valor |
|-------------------------------|--------------|---------------|-----------------------|---------|
| | | N=998 | Pré-vacina (N=802) | |
| 0-11 | 701(70,2) | 554(69,1) | 147(75,0) | |
| 12-24 | 213(21,3) | 188(23,4) | 25(12,5) | <0,001 |
| 24-59 | 84(8,4) | 60(7,5) | 24(12,2) | |
| Sexo | M | 436(54,4) | 113(57,7) | 0,427 |
| | F | 366(45,6) | 83(42,3) | |
| Vômito (24h) | Sim | 449(56,0) | 93(53,1) | 0,333 |
| | Não | 353(44,0) | 82(46,9) | |
| Episódio vômito (24h) | 1 | 34/497(6,8) | 14/89(15,7) | 0,018 |
| | 1-4 | 336/497(67,6) | 53/89(59,6) | |
| | >=5 | 127/497(25,6) | 22/89(24,7) | |
| Episódio diarreia (24h) | 1-4 | 469/799(58,7) | 71/187(38,0) | 0,001 |
| | 5 | 115/799(14,4) | 18/187(9,6) | |
| | ≥ 6 | 215/799(26,9) | 98/187(9,6) | |
| Febre (24h) | Sim | 490/802(61,1) | 78/171(45,6) | <0,001 |
| | Não | 312/802(38,9) | 93/171(54,4) | |
| HIV | Pos | 115/737(15,6) | 18/143(12,6) | 0,27 |
| | Neg | 622/737(84,4) | 125/143(87,4) | |
| Olhos encovados | Sim | 600(74,8) | 69/110(62,7) | 0,006 |
| | Não | 202(25,2) | 41/110(37,3) | |
| Prega cutânea | Sim | 597(74,4) | 70/108(64,8) | 0,024 |
| | Não | (25,6)205 | 38/108(35,2) | |
| Desidratação | Sim | (82,7)664 | 97/123(78,9) | 0,31 |
| | Não | 138(17,2) | 26/123(21,1) | |
| Tempo de internação (dias) | 1-4 | 396/789(50,2) | 112/174(64,4) | 0,002 |
| | 5 | 113/789(14,3) | 22/174(12,6) | |
| | ≥6 | 280/789(35,5) | 40/174(23,0) | |

Das 196 crianças observadas no período pós vacinal, 144/196 (73,4%) apresentaram o cartão de vacinação. Destas 129/144(89,5%) tinham recebido as duas doses, 15/144 (10,4%) receberam uma dose e 52/144 (36,1%) não receberam nenhuma dose da vacina. Dentre os 28 casos positivos no diagnosticados no período pós vacinal 19 (67,8%) tinham recebido pelo menos uma dose da vacina, sendo 17 /28 (60,7%) as duas doses, 2 /28(7,1%) uma dose e 9 /28

(32,1%) nenhuma dose. Na tabela abaixo está descritas de forma resumida as frequências dos casos positivos e negativos a RVA e o número de doses da vacina recebidas.

Tabela 4.3. Frequências dos casos positivos e negativos e estado de vacinação da criança observadas pós vacinal.

| RVA | uma dose | duas doses | Nenhuma dose | Total |
|-----------------|-----------------|-------------------|---------------------|---------------|
| Positivo | 2(7,10%) | 17(60,7%) | 9 (32,10%) | 28 (100%) |
| Negativo | 13(7,70) | 112(66,70) | 43(25,60%) | 168 (100%) |
| Total | 15 | 129 | 52 | 196 |

Na tabela abaixo, estão descritos os distritos municipais de proveniência dos participantes do estudo. A maior frequência de casos 594/998 (59,5%) foi observada nos distritos municipais da cidade de Maputo, seguido pelo município da Matola, com 294 /998 (29,4%) dos casos com amostras colhidas.

Tabela 4.4. Descrição dos locais de proveniência das crianças hospitalizadas no HCM com diarreia aguda, antes e depois da introdução da vacina RV1

| Distritos | Período | | Total |
|--------------|----------------|----------------|------------|
| | Pré-vacina (%) | Pós-vacina (%) | |
| KaMaxaquene | 110 (13,8) | 16(9,2) | 126 |
| KaTembe | 4(0,5) | 1(0,6) | 5 |
| KaMavota | 125(15,6) | 32(18,4) | 157 |
| KaMumbukuane | 113(14,1) | 22(12,6) | 135 |
| KaMphumo | 134(16,8) | 9(5,2) | 143 |
| KaNhaca | 2(0,2) | 0 | 2 |
| Matola | 273(34,1) | 21(12,1) | 294 |
| Lhamanculo | 12(1,5) | 14(8,0) | 26 |
| Outros | 27 (3,4) | 59(34,0) | 86 |
| Total | 800 | 174 | 974 |

4.3 Frequência de casos de RVA

Das amostras testadas por EIA, 267/998 (26,7 %) foram positivas para RVA, sendo 239/802 (30%) no período pré-vacinal e 28/196 (14,2%) no período pós-vacinal. A frequência anual dos casos de RVA foi: 107/324 (33,0%) em 2013; 50/194 (25,7 %) em 2014 e 82/284 (29%) em 2015. No período pós-vacina: 12/70 (17%) em 2016; 10/66 (15%) em 2017 e 6/60 (10%) em 2018 (Figura 4.1).

A figura 4.1 Descreve a frequência dos casos de RVA observados em crianças com gastroenterite aguda no HCM entre os anos de 2013 e 2018.

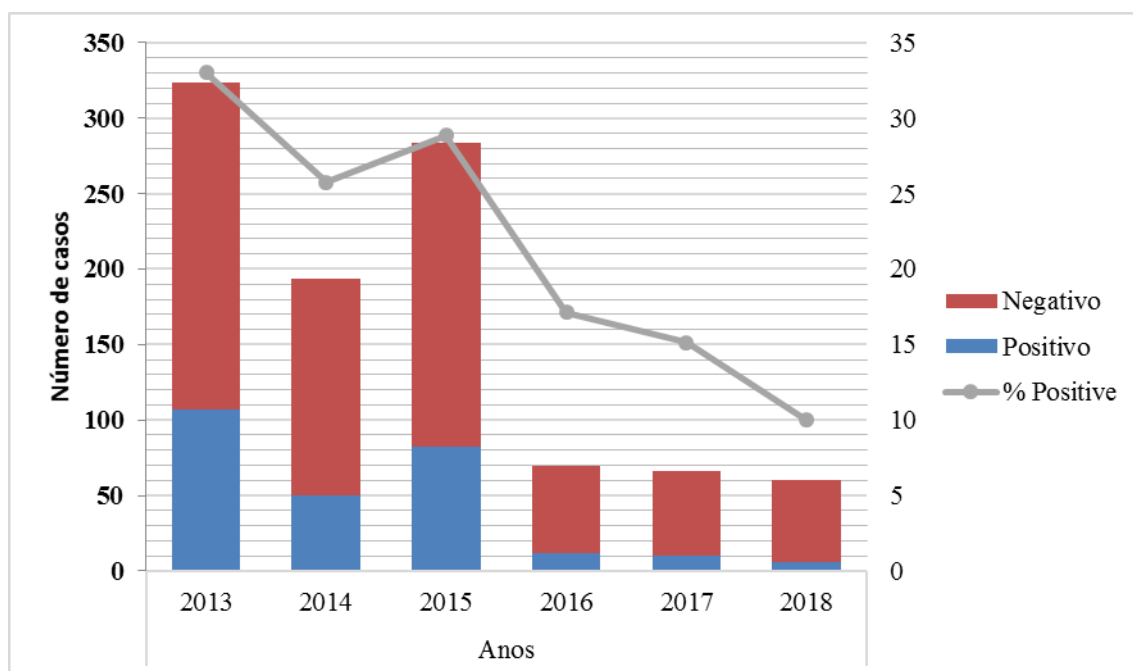


Figura 4.1. Número dos casos de testados e porcentagem de RVA durante o período estudado.

4.4 Distribuição dos casos de RVA por faixas etárias

Na figura 4. 2, estão descritos os grupos etários das crianças participantes do estudo. De 2013 a 2018 observou-se uma redução de hospitalização e da positividade em todas as faixas etárias, ao longo dos anos. Também é possível observar uma tendência do aumento dos casos nas faixas de 24-59 meses no período pós-vacina.

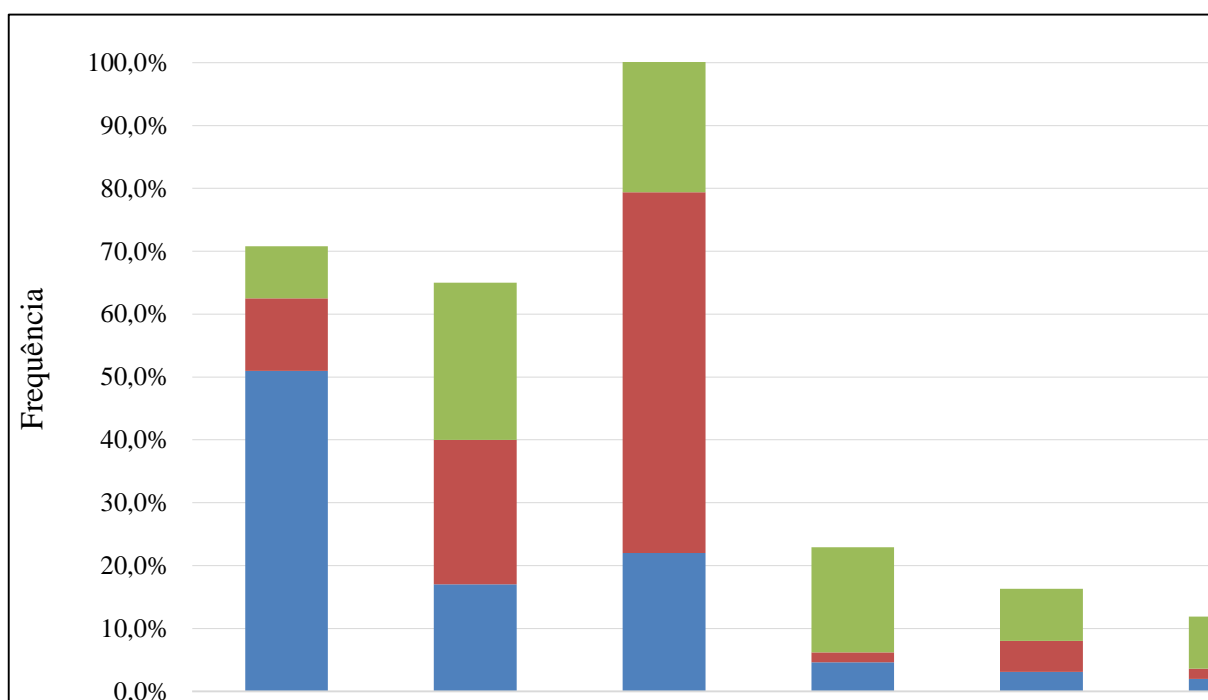


Figura 4.2. Frequência dos casos de RVA, por faixa etária, em crianças hospitalizadas no HCM antes e depois da introdução da vacina em Moçambique, 2013 a 2018. Onde, a cor azul representa a faixa de 0-11 meses, a cor vermelha a faixa de 12-23 meses e a cor verde a faixa etária de 24-59 meses.

Ao avaliar a distribuição dos casos de RVA por bairros municipais observou-se que no período pré-vacinal, houve maior frequência de casos nos bairros de Malhangalane 17/134 (12,7,7%), Maxaquene- A 18/110 (16,3) (36,7%) e Zimpeto 9/113 (7,9%). No período pós-vacina, a frequência foi maior nos bairros Malhazine 2/22 9% (100%), Aeroporto A com 2/14 7,1 (40%) e Mahotas 2/32 (6,3%) e, entretanto, verificou-se uma grande redução de casos nos bairros Zimpeto e Maxaquene e Mahangalene pertencentes aos municípios de KaMumbukuane, KaMaxaquene e KaMphumo respectivamente.

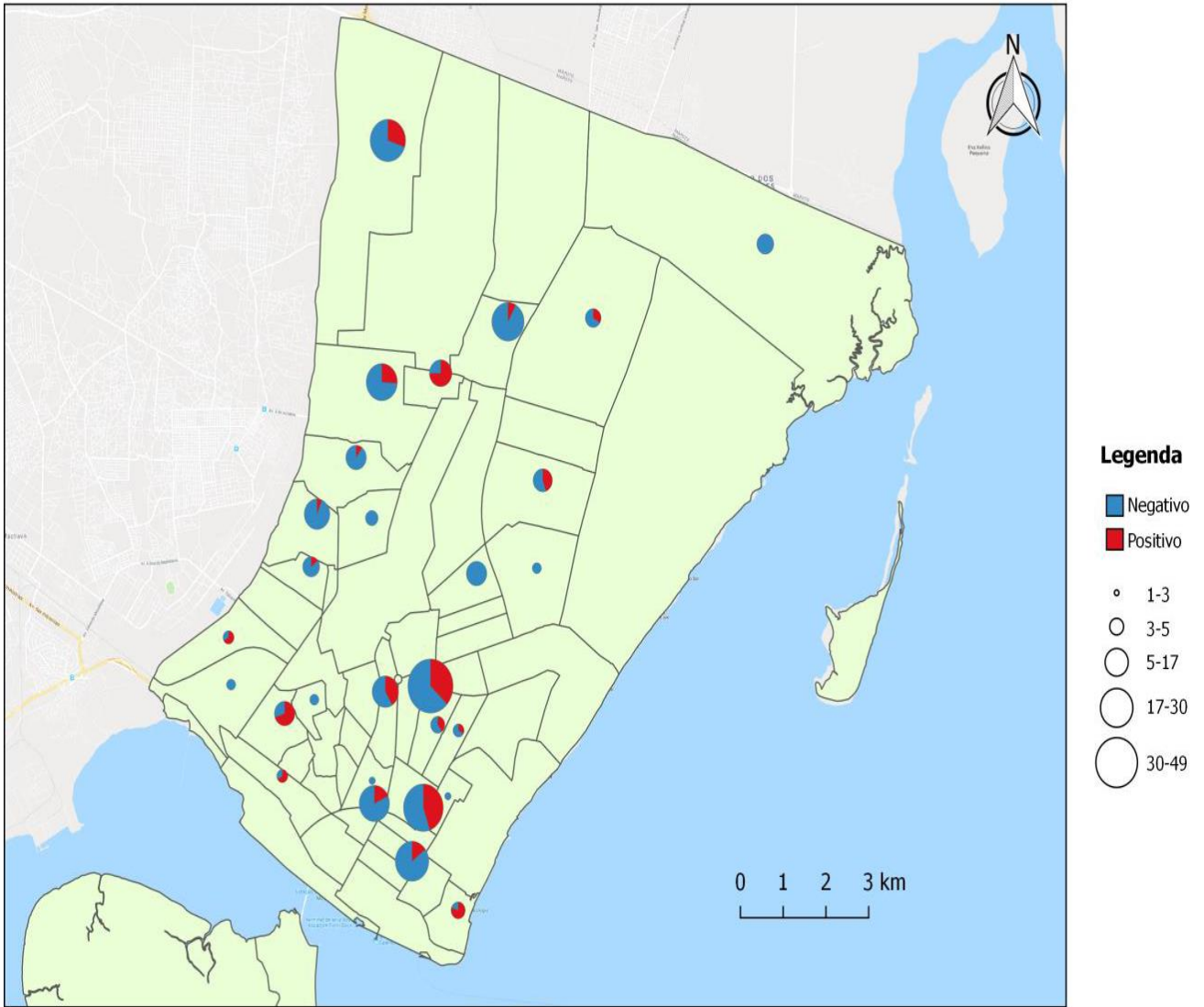


Figura 4.3 Frequência de casos RVA, por bairro, no período pré-vacina (2013 a 2015)

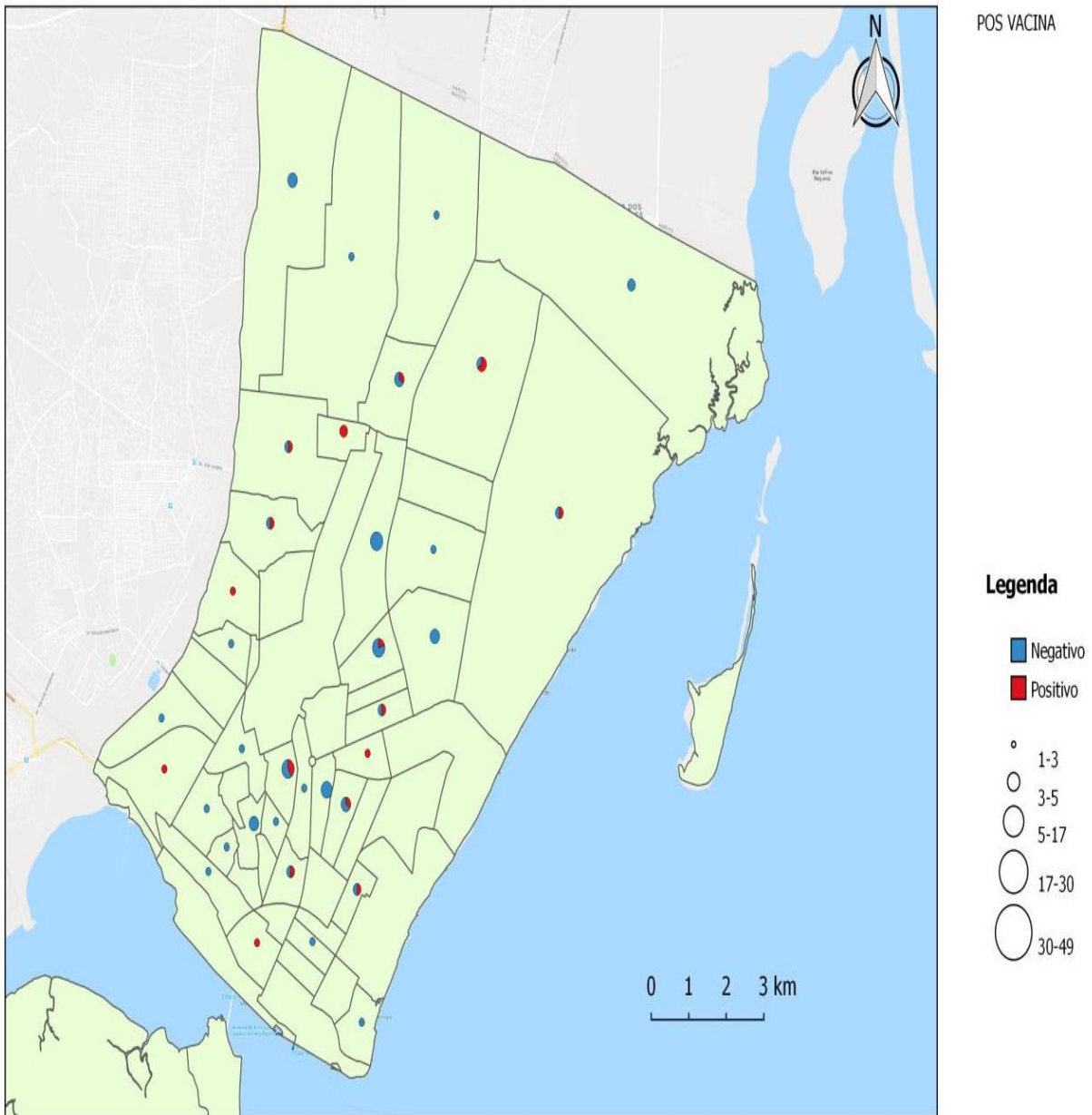


Figura 4.4. Frequência dos casos de RVA, por bairro, no período pós-vacina (2016-2018).

4.5 Distribuição temporal dos Rotavírus da espécie A

Ao longo do tempo em que foi realizado o estudo, foi possível observar a distribuição dos casos de RVA em relação aos meses dos anos. No período pré-vacinal, verificou-se distribuição característica da infecção, com picos nos meses de junho a agosto (período seco e frio em Moçambique). No entanto, um cenário diferente foi observado no período pós-vacinal, uma ocorrência ao longo dos anos mas compicos aumentados nos meses de setembro a outubro.

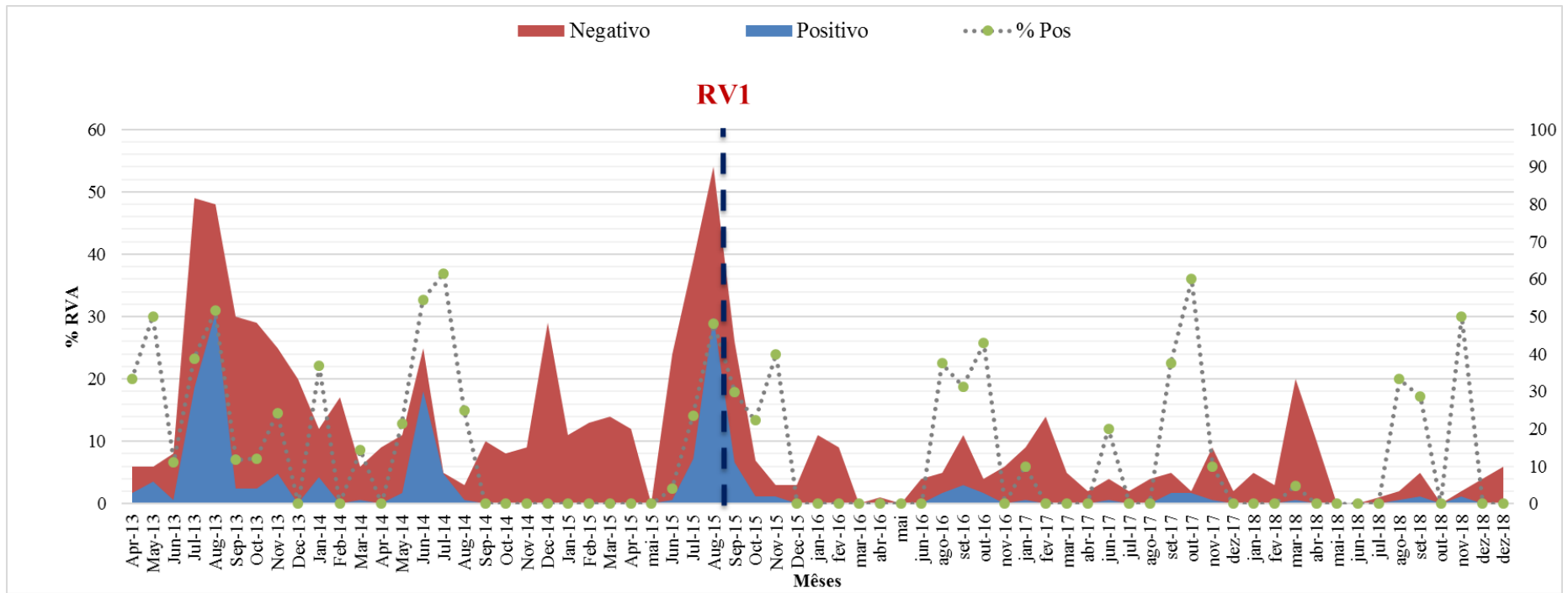


Figura 4.5. Frequência dos casos negativos e positivos a RVA por meses antes e depois da introdução da vacina RV1. A linha tracejada em azul indica o mês em que foi introduzida a vacina, em azul os casos positivos e vermelho os casos negativos.

4.6. Avaliação do impacto da vacinação contra o RVA em crianças menores de cinco anos em Moçambique

A tabela abaixo descreve de forma resumida os cálculos feitos para avaliação do impacto da vacina. Foi observada uma redução significativa de positividade de 28,8% da mediana para 15,5% ($p = 0,028$; OR= 0,43; IC,95%: (0,21-0,99) do período pré para o pós-vacinal, respectivamente. Uma redução similar foi observada na faixa de 0-11 meses de 28,29% para 13,04% ($p = 0,049$, OR=0,38; IC,95%: (0,15-0,96)

No entanto, não houve diferença estatística nas demais faixas etárias 12-23 meses ($p = 0,66$); OR= 0,38; IC,95% (0,298-23,5) e 24-59 meses ($p = 1,0$, OR=0,71 IC,95% (0,062-8,15).

A redução dos casos de RVA foi acompanhada pela redução dos casos de hospitalização por diarreia ao longo dos anos (Figura 4.1).

. Neste estudo, foi observada uma redução da mediana do total de número de casos testados em 76,7% (75,35 – 78,87%) e também, uma redução de 87,7% (85,37 - 92,68%) do número de casos positivos para RVA em todas as faixas etárias durante todo período estudado. Além disso, foi observada uma redução de 47,5% em todas as faixas etárias no intervalo de (40,63 - 65,37%) a proporção dos casos positivos para RVA de 2013 a 2018.

Durante o período pós-vacinal observou-se uma redução do tamanho de amostras testadas e do número dos casos positivos para RVA (Tabela 4.5). A mediana da idade da infecção por RVA apresentou um aumento de 9 meses para 11 meses nos intervalos de 8 a 11 meses e 7,5 a 11 meses entre os períodos pré e pós-vacinal respectivamente.

Tabela 4.5. Distribuição da redução dos casos de hospitalização por diarreia e RVA no HCM antes e depois da introdução da vacina em Moçambique, 2013 a 2018.

| Idade/Período | No. Testadas | No. Rotavirus Positivo | % Rotavirus Positivo | % Redução total testados | % Redução no rotavirus Positivo% | Redução na proporção rotavirus positivo | P Value* | OR | CI (95%) |
|----------------------------|---------------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---|--|-----------------|-----------|-----------------|
| Todos < 60 meses | | | | | | | | | |
| Mediana 2013-2015 | 284 | 82 | 28,87 | | | | | 1 | |
| 2016 | 70 | 12 | 17,14 | 75,35 | 85,37 | 40,63 | 0,05 | 0,51 | (0,26-0,99) |
| 2017 | 66 | 10 | 15,15 | 76,76 | 87,80 | 47,52 | 0,028 | 0,43 | (0,21-0,90) |
| 2018 | 60 | 6 | 10,00 | 78,87 | 92,68 | 65,37 | 0,029 | 0,46 | (0,22-0,94) |
| Mediana 2016-2018 | 66 | 10 | 15,15 | 76,76 | 87,80 | 47,52 | 0,028 | 0,43 | (0,21-0,90) |
| 0 - 11 meses | | | | | | | | | |
| Mediana 2013-2015 | 152 | 43 | 28,29 | | | | | | |
| 2016 | 60 | 9 | 15,00 | 60,53 | 79,07 | 46,98 | 0,05 | 0,45 | (0,20-0,98) |
| 2017 | 46 | 6 | 13,04 | 69,74 | 86,05 | 53,89 | 0,049 | 0,38 | (0,15-0,96) |
| 2018 | 41 | 4 | 9,76 | 73,03 | 90,70 | 65,51 | 0,014 | 0,27 | (0,09-0,81) |
| Mediana 2016-2018 | 46 | 6 | 13,04 | 69,74 | 86,05 | 53,89 | 0,049 | 0,38 | (0,15-0,96) |
| 12-23 meses | | | | | | | | | |
| Mediana 2013-2015 | 51 | 14 | 27,45 | | | | | | |
| 2016 | 5 | 1 | 20,00 | 90,20 | 92,86 | 27,14 | 1,00 | 0,66 | (0,06-6,43) |
| 2017 | 12 | 3 | 25,00 | 76,47 | 78,57 | 8,93 | 1,00 | 0,88 | (0,20-3,73) |
| 2018 | 8 | 1 | 12,50 | 84,31 | 92,86 | 54,46 | 0,665 | 0,38 | (0,298-23,5) |
| Mediana 2016-2018 | 8 | 1 | 12,50 | 84,31 | 92,86 | 54,46 | 0,665 | 0,38 | (0,298-23,5) |
| 24-59 meses | | | | | | | | | |
| Mediana 2013-2015 | 18 | 3 | 16,67 | | | | | | |
| 2016 | 5 | 2 | 40,00 | 72,22 | 33,33 | -140,00 | 0,290 | 3,30 | (0,37-29,3) |
| 2017 | 8 | 1 | 12,50 | 55,56 | 66,67 | 25,00 | 1,00 | 0,71 | (0,062-8,15) |
| 2018 | 11 | 1 | 9,09 | 38,89 | 66,67 | 45,45 | 1,00 | 0,50 | (0,045-5,51) |
| Mediana 2016-2018 | 8 | 1 | 12,50 | 55,56 | 66,67 | 25,00 | 1,00 | 0,71 | (0,062-8,15) |

4.7. Resultados dos modelos de regressão binomial logística (avaliação da gravidade clínica)

1. As crianças hospitalizadas no do período Pré-vacinal possuem uma chance 90% maior de desenvolver febre do que aquelas do período Pós (OR= 1.90; IC=1.36-2.65; p=0.0001),
2. A chance das crianças hospitalizadas apresentar vômito foi 15% maior no periodo pré vacinal do que no período Pós vacinal (OR= 1.15, IC= 0.83-1.60 p= 0.37).
3. As crinaças hospitalizadas no período Pré-vacinal possuem uma chance 34% maior de apresentarem desidratação que do aquelas do período Pós (OR= 1.34, IC= 0.82-2.11 p= 0.22).

4.8. Distribuição dos genótipos G e P

Do total das amostras positivas por EIA 226/267(84,6%) tiveram material suficiente e, foram submetidas à amplificação genômica para a identificação dos genótipos G e P. Do total de 226 amostras positivas, o genótipo G foi identificado em 222/226 (98.2%) e o genótipo P em 222/226 (98,2%).

Nas tabelas 4.5 e 4.6 esta representada a distribuição das frequências dos genótipos G e P antes e depois da introdução da vacina. Dentre os genótipos G, os mais frequentes foram: no periodo pré vacina G2 96/205 (46,8%), G9 53/205(26,0%) e G1 43/201(21,1%). Porém ao análizar o período pós vacinais podem constatar se que o genótipo G1 11/21(52,4%) foi mais frequente seguido pelos genótipos G3 4/21(19,0%) e G9 2/21(9,5%). Em relação ao genótipo P, no período pré vacina o genótipo P[8] 106/205(51,7%) foi o mais frquente; seguido pelos genótipos P[4] 70/205(34,1%) e P [6] 25/205(11,5%). O período pós vacina caracterizou-se pela persistência da predominância do genótipo P [8] 13/21 (61,9%), seguido pelos genótipos P[4] 6/21 (28,6%) e P[6]2/21(9,5%).

Tabela 4.6. Frequência dos genótipos G de RVA antes e depois da introdução da vacina em Moçambique.

| Genótipos | Período | | Total |
|-----------|---------------|---------------|-------|
| | Pré-vacina(%) | Pós-vacina(%) | |
| G1 | 43(21,1) | 11(52,4) | 54 |
| G2 | 96(46,8) | 1(4,8) | 97 |
| G3 | 1(0,5) | 4(19) | 5 |
| G4 | 2(1,0) | 1(4,8) | 3 |
| G8 | 1(0,5) | 0 | 1 |
| G9 | 53(26,0) | 2(9,5) | 55 |
| G12 | 5(2,5) | 0 | 5 |
| G12G3 | 0 | 1(4,8) | 1 |
| G9G3 | 0 | 1(4,8) | 1 |
| GNT | 4(2,0) | 0 | 4 |
| Total | 205 | 21 | 226 |

Tabela 4.7. Frequência dos genótipos P de RVA antes e depois da introdução da vacina em Moçambique. P[nt]*- genótipo P não tipáveis.

| Genótipos | Período | | Total |
|-----------|---------------|---------------|-------|
| | Pré-vacina(%) | Pós-vacina(%) | |
| P[4] | 70(34,1) | 6(28,6) | 76 |
| P[6] | 25(12,2) | 2(9,5) | 27 |
| P[8] | 106(51,7) | 13(61,9) | 119 |
| P[6]/P[8] | 2(0,98) | 0(0,0) | 2 |
| P[NT]* | 2(0,98) | 2(9,5) | 2 |
| Total | 205 | 21 | 226 |

Durante o período de estudo observou-se uma diferença no perfil da combinação dos genótipos de rotavírus. Os mais frequentes por ano foram: G2P [4] 62/86 (72%)- 2013; G1P

[8] 31/48(65%)- 2014; G9P [8] 48/70(69%)- 2015; G1P [8] 5/10(50%)- 2016; G1P [8] 5/8(62,5%)-2017 e 1/3 (33%) G3P [4], G4P [6], G3P [8] 2018 (Figura 4.6).

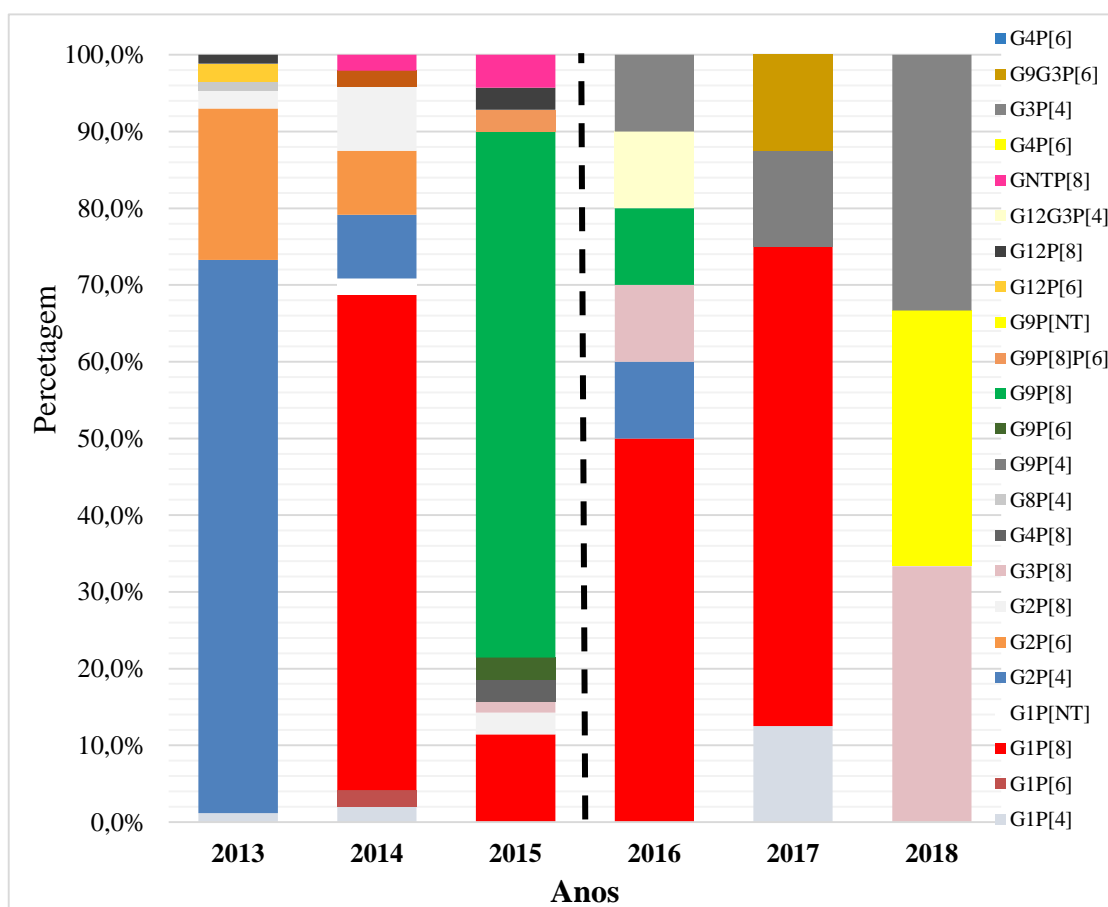


Figura 4.6. Distribuição da combinação dos genótipos G e P por ano, antes e depois da introdução da vacina. A linha tracejada representa o período da introdução da vacina em Moçambique.

Ao analisar a distribuição das frequências das combinações dos genótipos G e P por faixa etária foi verificado que na faixa entre 0-11 meses, as combinações mais frequentes nos dois períodos foram: G2P[4] 63/160(39,4%) seguido de G1P[8], G9P[8] 29/160 (18%) e G2P[6] 18/160 (11,2%).

Na faixa dos 12-23 meses as combinações mais frequentes foram: G9P[8] 17/53(32,1%) seguido de G1P[8] 15/53(28,3%) e G2P[8] 6/53(11,3%). Enquanto que as combinações de G1P[8] 5/12 (41,7%), G9P[8] 3/12(25,0%) e G1P[4], G2P[4], GNTTP[4] 1/12 (8,3%) na faixa de 23-59 meses.

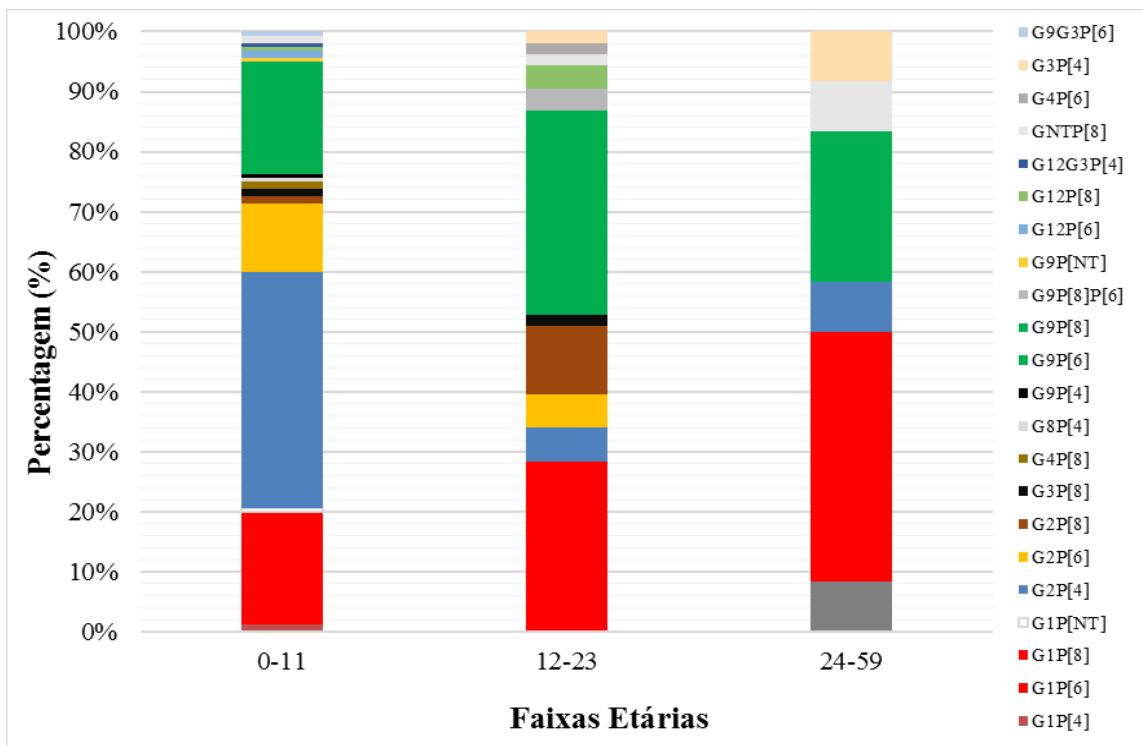


Figura 4.7. Distribuição da combinação dos genótipos G e P por faixa etária, durante o período estudado.

4.9. Distribuição comparativa da combinação dos genótipos G e P antes e depois da vacina RV1.

O período pré-vacina caracterizou-se com maior diversidade das combinações dos genótipos comuns com maior frequência das combinações G2P [4] (34%), G9P [8] (26%) e

G1P[8] (18%). Enquanto que no período pós-vacina predominou a combinação G1P[8](48%).

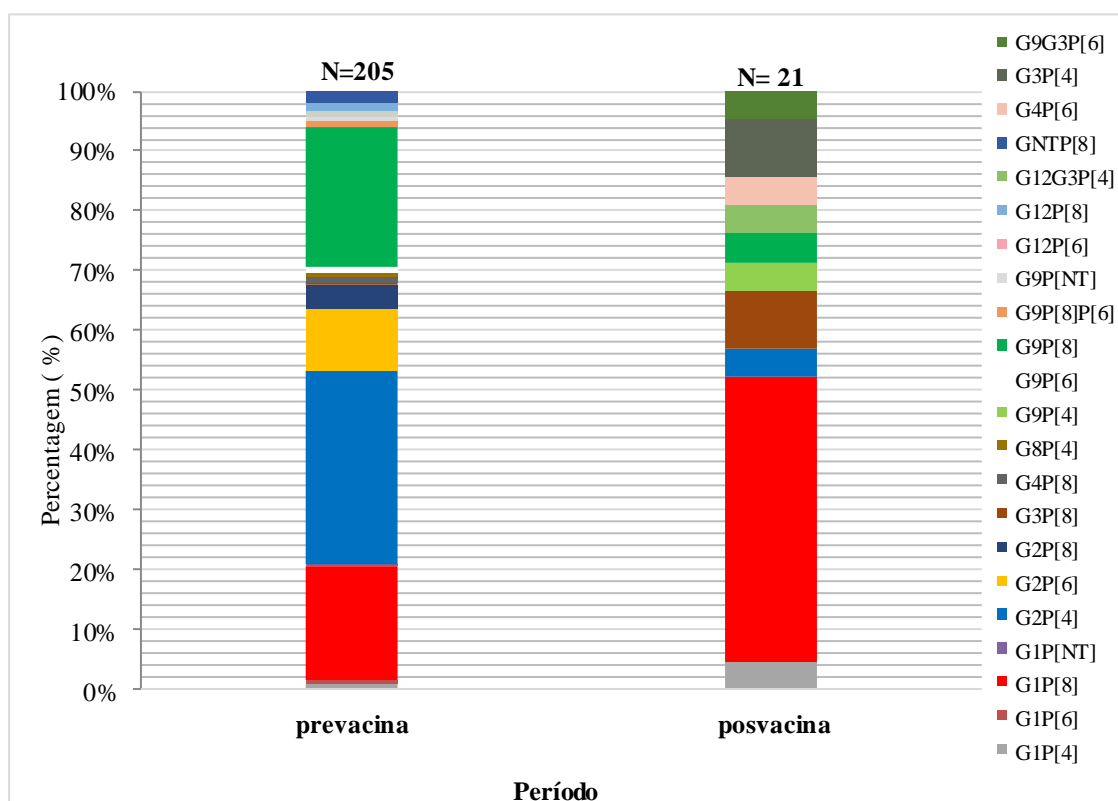


Figura 4.8 .Comparação das combinações dos genótipos G e P antes e depois da introdução da vacina RV1 em Moçambique.

4.10 Distribuição dos Genótipos G e P por meses antes e depois da vacina RV1.

A distribuição dos genótipos G no período pré-vacinal caracterizou-se pela circulação dos genótipos G2, G1, G9 nos meses de junho, agosto e setembro, enquanto no período pós-vacina notabilizou-se pelo aumento do genótipo G1 no mês de outubro (Figura 6.15). Quanto ao genótipo P, o período pré-vacina caracterizou-se pela diversidade de genótipos P[4], P[6] e P[8] com pico nos meses de junho e julho. No período pós-vacinal destacou-se pela predominância de genótipo P[8] em todos os meses (Figura 4.9).

As figuras 6.15 e 6.16 apresentam a distribuição das combinações dos genótipos G e P mais frequentes por meses. No período pré-vacinal observou-se picos das combinações dos genótipos G2P[4], G1P[8] e G9P[8] nos meses de junho, julho e setembro. Enquanto que no período pós foram observados picos de combinação do genótipo G1P[8] nos meses de outubro a novembro (Figura 4.11).

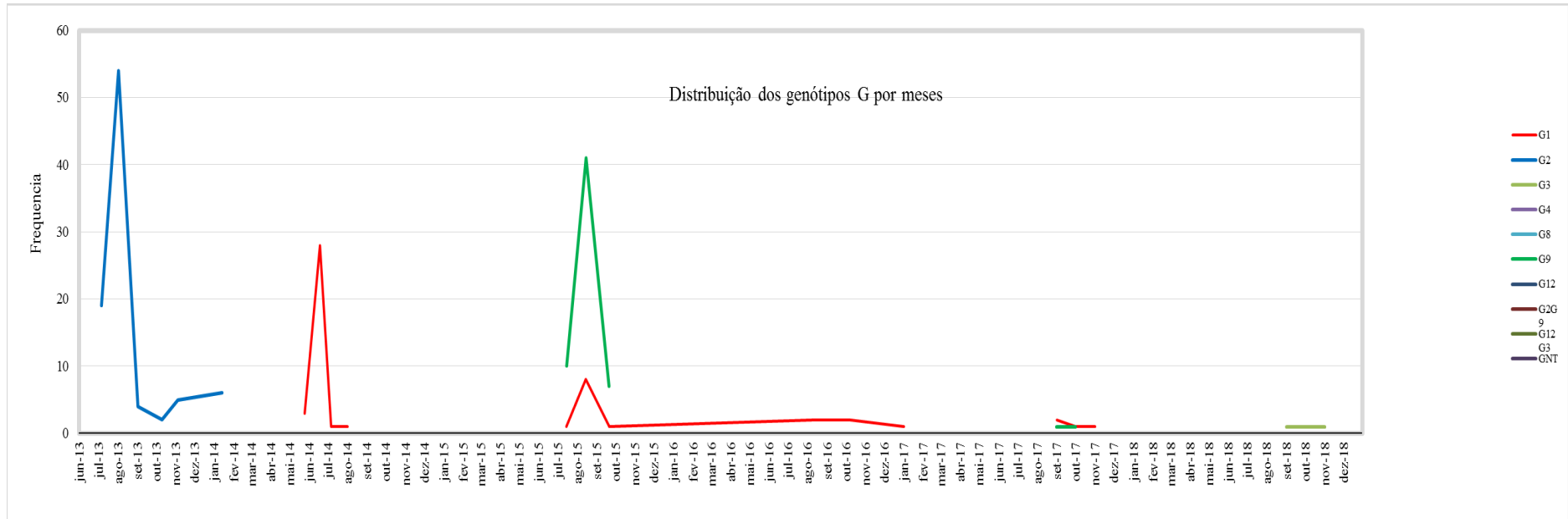


Figura 4.9. Distribuição dos genótipos G por meses antes e depois da introdução da vacina RV1.

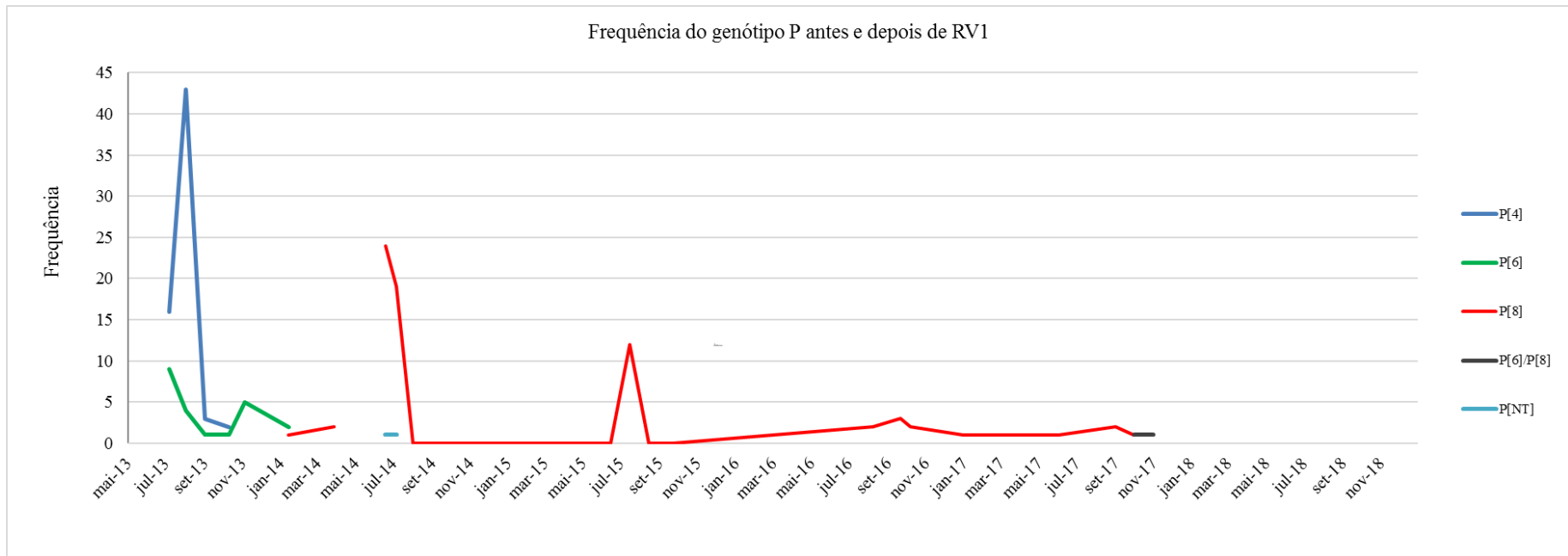


Figura 4.10. Distribuição dos genótipos P por meses antes e depois da introdução da vacina RV1.

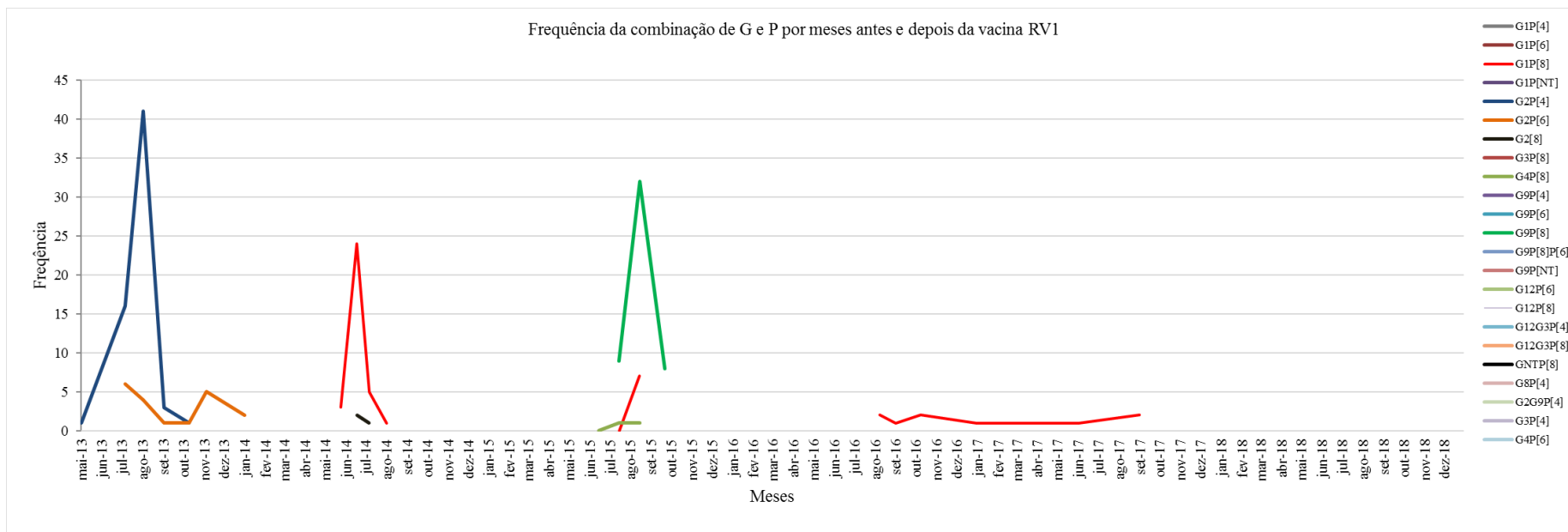


Figura 4.11. Distribuição das combinações dos genótipos G e P por meses antes e depois da introdução da vacina RV1

Na figura abaixo está representada análise filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (896 pb) do gene que codifica para a proteína VP7. Pela análise de sequências obtidas do gene VP7 das amostras estudadas permitem caracteriza-las em G1, G3,G9, formando três clusters. No cluster do genótipo G1, é possível observar se que as amostras do estudo demonstram uma estreita relação genética com as estipes circulantes na Índia.

No cluster G3, as amostras do estudo estão agrupadas com as amostras do Paquistão. No cluster com genótipo G9 pode se observar que as amostras do estudo estão relacionadas com as amostras de República do Zimbábue da Itália e do Japão.

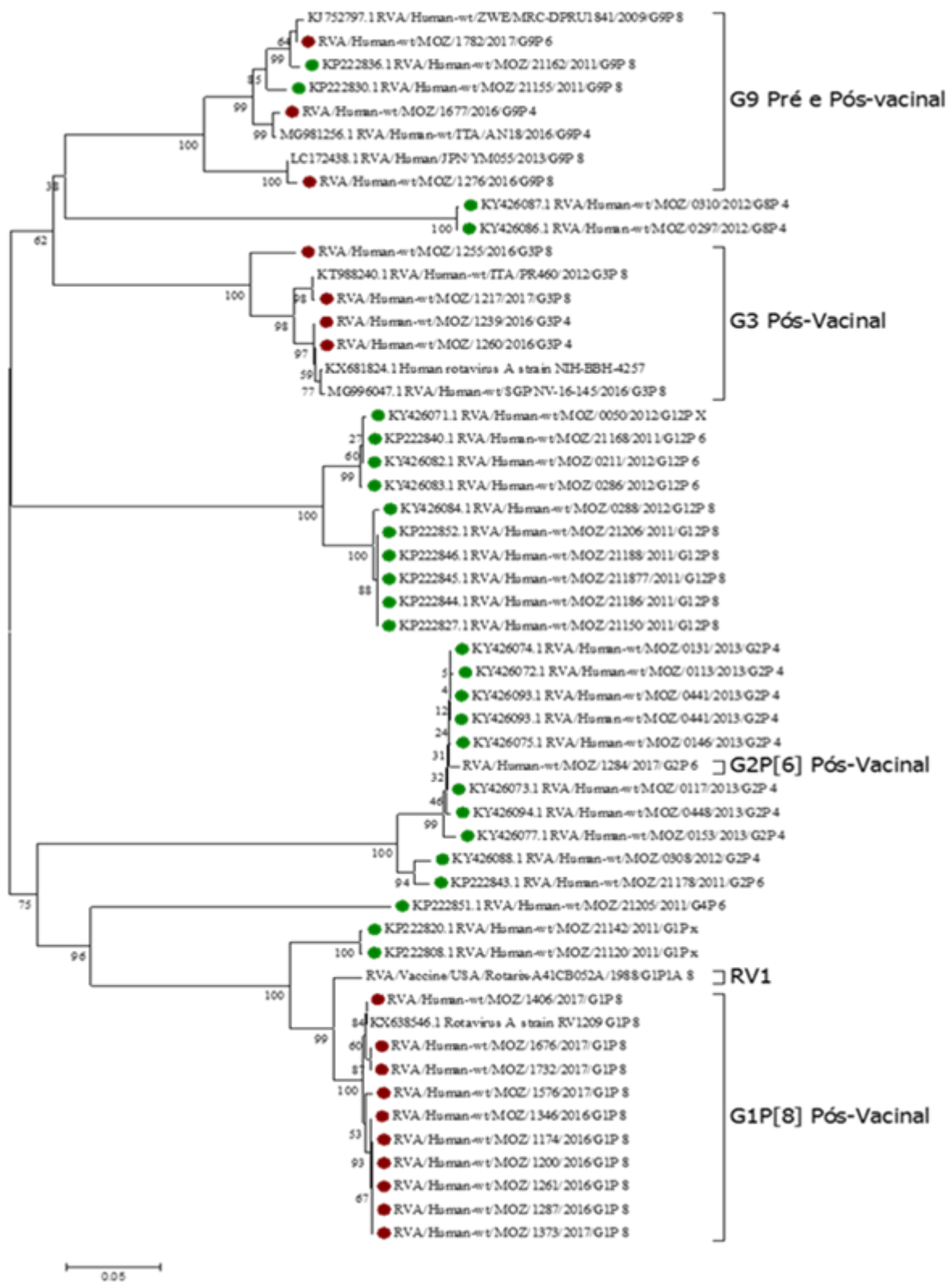


Figura.4. 12. Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (896 pb) da região codificante da proteína VP7 de amostras de rotavírus da espécie A detectados no HCM em Moçambique de de 13 abril a 31 Dezembro 207 . Os círculos s preenchidos a vermelho

representando as amostras do estudo e protótipos de representantes de diferentes genótipos humanos do período pós vacinal e a verde do período pré vacinal. Os valores de Bootstrap (2.000 réplicas) estão indicados na árvore filogenética, valores menores que 50% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho apresentamos um dos primeiros resultados após a introdução da vacina contra a infecção por RVA em Moçambique. A vacina Rotarix (RV1) foi introduzida no mês de setembro de 2015, através do Programa Alargado de Vacinação (PAV). Após a sua introdução, verificou-se uma grande redução no número de casos de hospitalização por diarreia, em crianças menores de cinco anos, atendidas no serviço de pediatria do Hospital Central de Maputo.

Estes achados são similares aos observados em outros países africanos, que tem reportado continuamente a redução dos casos de internação por diarreia em crianças menores cinco anos depois da introdução da vacina contra RVA (104) (153)(154). Provavelmente, esta redução no número de hospitalização por diarreia ao longo dos anos, não seja somente atribuída à vacina, mas também, em grande parte, às campanhas mundiais de tratamento da doença diarreica com a terapia de reidratação oral (TRO), suplementação com zinco e à melhoria das condições de higiene (139).

Na província e cidade de Maputo, onde o estudo foi realizado, as taxas de cobertura vacinal de RV1 aumentaram de 80 a 90% de 2016 a 2018 (155). Apesar de não se ter feito o teste estatístico específico para este dado, essa constatação do aumento das taxas de cobertura vacinação da vacina RV1 longo dos anos, leva relacionar a redução dos casos com o impacto da vacina monovalente Rotarix (RV1) (156).

O período pré-vacinal caracterizou-se por uma elevada frequência dos casos de diarreia acompanhada com altas taxas de positividade da infecção de RVA, principalmente em crianças menores de um ano de idade, chegando a atingir mais da metade das crianças infectadas por rotavírus. Estes achados são concordantes com os resultados anteriores reportados em Moçambique (157) Resultados similares foram apresentados por N.de Deus e colaboradores (2018). Nesse estudo, os autores também observaram maior número dos casos positivos para RVA em crianças com diarreia aguda nas faixas da faixa etária de 0 a 11 meses de idade com uma frequência de 51,6% , atendidas no Hospital Geral de Mavalane na cidade de Maputo.

Entretanto, estes dados contradizem com os publicados em 2016 por Langa e colaboradores no ChóKwè no estudo sobre a Epidemiologia de diarreia por rotavirus A, que reportaram maior positividade na faixa de 7 a 12 meses.

Vários fatores podem estar relacionados a esse fato, provavelmente, a imunidade seja a mais relacionada, considerando também que cerca de 14% das crianças observadas neste estudo eram soropositivas e 12% malnutridas. Estes dados são similares com estudos

antecedentes que demonstraram que crianças da faixa de 0 -11 meses de idade e com situação imunitária comprometida são mais susceptíveis a contraírem infecções por rotavírus (113)(158).

Em países subdesenvolvidos e com baixa renda a infecção por rotavirus ocorre de forma precoce em crianças menores que um ano de idade, provavelmente devido a baixa imunidade natural adquirida, deficiência do sistema imune e as altas cargas virais (159). No entanto, acredita-se que, a primeira infecção natural por rotavirus não confere uma proteção clínica significativa durante a reinfecção (77) (78). Estudos realizados em África e na América Latina demonstram que infecções recorrentes por RVA são menos graves que as primeiras infecções (160)(161) .

Considerando-se que a capacidade de produção de anticorpos é dependente da idade. Já foi comprovado que a infecção precoce pode não produzir de forma eficiente a resposta protetora do sistema imune, conseqüentemente diminuir a eficácia da infecção natural em induzir altos níveis de anticorpos protetores (78).

Durante o período pós-vacinal, observou-se uma redução de mais da metade dos casos positivos para RVA em todas as faixas etárias. Esta redução foi mais notável na faixa de 0-11 meses. Dados semelhantes foram previamente reportados em Moçambique (157). Resultados similares foram também observados em vários países de África como Zimbábue, Zâmbia, Gana e Malawi (112)(162) (163), sustentando a hipótese de que a redução pode estar relacionada com a introdução da vacina no Programa alargado de Vacinação (104)(103) e ao aumento das coberturas vacinais de 76 % em 2016 para 90% em 2017 (156).

É importante salientar que nem todas as crianças foram alcançadas com a vacinação, e que nem todas completaram as duas doses da vacina. Essas observações sugerem que algum tipo de imunização coletiva ou de rebanho tenha desempenhado papel fundamental na redução de hospitalizações por diarreia associada a rotavírus em todas as faixas etárias, apesar de menor tamanho amostral observado em crianças não vacinadas (164).

No presente estudo, não encontramos nenhuma diferença estatística significativa entre as positivas ao RVA vacinadas que receberam uma dose e as completaram o esquema vacinal de duas doses ($P=0,71$). No entanto, esses resultados necessitam de futuras confirmações, pois este trabalho foi realizado em um período de apenas três anos após a introdução da vacina. Estudos realizados sobre a eficácia e eficiência da vacina RV1 apresentam evidências de que um esquema vacinal incompleto (uma dose apenas) confere uma boa proteção, apesar de ocorrer em níveis inferiores a observada em crianças que receberam o esquema vacinal completo (158)(165).

Apesar de não ter sido objetivo deste estudo, ao avaliar a co-infecção do RVA com HIV, foi possível observar que 30.3% das crianças eram co-infectadas. Este fato provavelmente deve-se à alta prevalência de HIV, já reportado por indicadores de Imunização, Malária e HIV/SIDA em Moçambique (IMASIDA 2015), realizado pelo Ministério da Saúde (Instituto Nacional de Saúde) demonstrando uma prevalência de 26% na população com idade sexualmente ativa de 15-49 anos na cidade de Maputo. Para melhor entender o impacto da coinfeção do rotavírus e HIV na cidade de Maputo são necessários mais estudos com uma metodologia adequada.

No presente trabalho, confirmamos a consistência da distribuição de rotavírus ao longo do ano, onde, no período pré-vacinal, observou-se um padrão característico de distribuição sazonal dos RVA, com grande número de casos positivos nos meses de junho e julho que, em geral, são os meses mais frios e secos do ano em Moçambique.

Vários trabalhos reportam que a sazonalidade dos casos de RVA está correlacionada com a redução da umidade relativa do ar, resultando em maior viabilidade das partículas virais e aumento da dispersão por aerossóis. Nos países vizinhos a Moçambique, onde a variação da umidade é bastante semelhante aquela observada em Maputo, identificou-se um perfil sazonal similar da infecção por RVA (166) (167).

Durante o período pós-vacinal, foi observada uma alteração no padrão temporal da infecção por rotavírus nos meses de inverno (junho a agosto) para os meses de outubro a novembro. Este evento também está em concordância com os resultados reportados pelos países vizinhos, depois da introdução da vacina (112)(141)(168).

Esta mudança da época de pico do rotavírus após a introdução da vacina tem sido observada em muitos países no mundo (154) (131) entretanto, ainda não está claramente explicada. Acredita-se que, provavelmente, seja devido a uma diminuição no número de crianças suscetíveis não vacinadas, resultando em redução da intensidade de transmissão da infecção entre crianças susceptíveis. Curiosamente, esta hipótese é sustentada pela tendência do aumento de casos de RVA em crianças >24 meses não vacinadas, no período pós-vacinal.

Em Moçambique, a disponibilização da informação da circulação da infecção por rotavírus ao longo do ano é de crucial importância para o clínico. Essa informação pode ajudar a prever os possíveis surtos e melhorar o manejo clínico dos casos de diarreia (169)(134). No entanto, na rotina clínica, tem sido muito difícil diferenciar casos de diarreia por rotavírus dos casos causados por outros agentes etiológicos baseando-se somente em características clínicas. Sendo assim, são necessários métodos adequados para a essa

diferenciação. Assim, pode-se evitar o uso inadequado de antibióticos nos casos de diarreias virais.

Durante o período de estudo observou-se uma grande oscilação na distribuição da combinação dos genótipos. Este fato provavelmente se deve à oscilação anual natural e geográfica dos genótipos de rotavírus(170). Dados similares vem sendo reportados em outros trabalhos realizados em África antes da introdução da vacina(123). Mas, ainda não há evidências suficientes que sustentem que a diversidade e oscilação dos genótipos tem um impacto específico na eficácia da vacina na África, podendo existir vários fatores que podem estar relacionados (170).

A frequência de detecção de G2P[4] e G9P[8] diminui abruptamente nos três anos depois da introdução da vacina. Em contraste com resultados observados em alguns países da América Latina onde reportam a predominância heterotípica do genótipo G2P[4] depois da introdução (171). Esse fato tem gerado um grande debate na comunidade científica, porque ainda pouco se sabe se este achado está diretamente relacionado com efeito da vacina ou reflete uma variação natural na prevalência das estirpes de rotavírus(172)(173). Por outro lado, observou-se um aumento do genótipo G3 raramente detectado em Moçambique em combinação com P[4], P[6], P[8], porém em baixa proporção. Estes achados não são concordantes com os observados no país vizinho Madagascar onde não foi possível detectar G3P[8] nem G1P[8], pós vacina (154).

Em primeira observação, parece que o genótipo G1 não foi afetado pela vacina. No entanto, esses resultados devem ser interpretados com muito cuidado, pois é sabido que existem diferentes linhagens do genótipo G1 que podem co-circular na mesma estação, ou oscilar ao longo de diferentes estações (174).

Acredita-se que algumas linhagens de G1 podem ser selecionadas devido à pressão seletiva da vacina, podendo resultar na divergência de algumas estirpes de G1 que podem não ser afetadas pela estirpe vacinal. Para melhor entender este cenário, há necessidade de se realizar mais estudos filogenéticos e análises do genoma completo do rotavírus.

Diferentes dos outros estudos, observou-se uma redução da ocorrência do G12 após a introdução da vacina. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar se este achado está associado a introdução da vacina ou a oscilação natural das estirpes já acima descrita (122)(114)(131).

A emergência de G9P[4] em Moçambique foi intrigante. O aumento da documentação desta estirpe tem sido observado em muitos países depois da introdução da vacina monovalente (175) (154)(131). Mas ainda pouco se sabe se o seu aumento seja devido à

introdução da vacina. Resultados apresentados no Gana admitem que provavelmente o seu aumento esteja relacionado com o aumento do processo recombinação na comunidade (176).

A tendência aumentada da detecção de genótipos mistos após introdução da vacina é de crucial importância, pois existem poucas evidências em relação à capacidade de induzir proteção heterotípica contra estas estirpes G12 para ambas vacinas. (122)(177)

A vacina monovalente Rotarix introduzida no sistema de vacinação em Moçambique está direcionada a estirpe G1P[8]. Apesar de ser considerada heterotípica, presume-se que esteja a selecionar estirpes com ela relacionadas, o que faz com que as outras estirpes não relacionadas emergjam. A cidade e províncias de Maputo, local de origem da maior parte dos casos isolados neste estudo, têm apresentado grandes problemas de saneamento básico, o que pode provavelmente justificar o surgimento de estirpes mistas no período vacinal (158) (178).

É sabido que a distribuição de genótipos de RVA flutua tanto no decorrer do tempo quanto nas diferentes regiões geográficas. No entanto, os mecanismos envolvidos neste fenómeno ainda não estão bem claros (179).

Quando comparamos os dados das sequências obtidas depois da introdução da vacina correspondentes aos genótipos G1, G3 e G9 com os protótipos obtidos no Genbank, os resultados revelam que os protótipos de estudo agrupam em 99-100% com os protótipos dos outros países e não com os que circulam em Moçambique. Estes resultados sugerem a necessidade da realização de mais estudos para monitorar a evolução das estirpes de RVA depois da introdução da vacina em Moçambique.

Diante dessas considerações, a continuação da vigilância de estirpes de rotavírus depois da introdução da vacina é de crucial importância para a identificação das estirpes emergentes, assim como para a avaliação da eficácia vacinal em diferentes regiões do país.

6. CONCLUSÕES

- Os dados deste estudo reforçam a importância e a eficácia da vacina RV1 através da redução dos casos de diarreia e de internação por gastroenterite em Moçambique, causada por RVA em todas as faixas etárias;
- Observou-se a mudança na prevalência por faixa etária representada por uma tendência de aumento de casos de internação por diarreia atribuída aos RVA em crianças maiores de 12 meses;
- A redução da gravidade da doença diarreica em crianças hospitalizadas no período pós-vacinal em relação ao pré-vacinal (RV1) mostra a importância da manutenção e o aperfeiçoamento do programa de imunização de Moçambique;
- Observou-se uma mudança no perfil de distribuição temporal da infecção por RVA;
- Observou-se uma variação do perfil das estirpes de rotavirus ao longo dos anos deste estudo.
- Foi possível observar uma redução dos genótipos P[4], P[6] e das combinações mais comuns G2P[4] e G9P[8];
- Apesar da redução do número de amostras positivas, a diversidade das estirpes de RVA circulantes e a introdução de novos genótipos permanecem um grande desafio para a eficácia das vacinas.

7. LIMITAÇÕES

A primeira limitação deste estudo, é o fato de ter sido realizado apenas em doentes internados, provenientes da zona urbana, que podem não representar o cenário da infecção na região rural ou dos doentes ambulatoriais. Entretanto, estudos antecedentes realizados em diferentes áreas de Moçambique, não apresentam muita diferença na distribuição dos genótipos nesses grupos.

No entanto, em nosso estudo, excluímos crianças que morreram com diarreia, sendo assim, os nossos dados subestimam o número total dos casos óbitos por diarreia como diarreia por rotavírus.

8. PERSPECTIVAS

Este trabalho apresenta uma iniciativa conjunta entre o Ministério da Saúde (Instituto Nacional de Saúde) e Ministério de Ciência e de Tecnologia de Moçambique no sentido de implantar no país a detecção e caracterização molecular dos RVA.

Nossos objetivos precípuos são de contribuir para o desenvolvimento científico e disponibilizar informação possa ajudar na melhoria dos qualidades para melhoria de qualidade de vida população Moçambicana. Com vista a atender esses anseios, pretendemos dar continuidade às pesquisas com os RVA e, para tanto, as seguintes abordagens serão desenvolvidas:

Sequenciar as amostras que não puderam ser genotipadas para as proteínas VP4 e VP7.

- ✓ Introduzir a metodologia de biologia molecular em Moçambique como técnica de rotina para a pesquisa dos RVA e seus genótipos, permitindo uma melhor compreensão da alternância entre estes ao longo dos anos, bem como conhecer a dinâmica desta infecção viral.
- ✓ Investigar outros vírus entéricos, tais como: astrovírus, adenovírus e norovírus, por meio de metodologias moleculares e identificar casos de co-infecção com RVA.
- ✓ Vigilância Epidemiológica e Laboratorial (determinação dos genótipos) dos RVA em Moçambique, antes que uma vacina anti-RVA introduzida no país pelo PVA

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lanata CF, Fischer-walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children , 5 Years of Age : A Systematic Review. 2013;8(9):72788.
2. Kotloff KL, Platts-mills JA, Nasrin D, Roose A, Blackwelder WC, Levine MM. Summary of workshop “ global burden of diarrheal diseases among children in developing countries : Incidence , etiology , and insights from new molecular diagnostic techniques ”. *Vaccine*. 2017;35(49):6783–9.
3. Troeger C, Forouzanfar M, Rao PC, Khalil I, Brown A, Reiner RC, et al. :Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal disease a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017;17(9):909–48.
4. Collaborators D. Global , regional , and national life expectancy , all-cause mortality , and cause-specific mortality for 249 causes of death , 1980 – 2015 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. 2017;388:1459–544.
5. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. *The Lancet* [Internet]. 2013;382(9888):209–22. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2)
6. Nhampossa T, Mandomando I, Acacio S, Quintó L, Vubil D, Ruiz J, et al. Diarrheal disease in rural Mozambique: Burden, risk factors and etiology of diarrheal disease among children aged 0-59 months seeking care at health facilities. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0119824.
7. MISAU. Nacional Intra-Hospitalar Moçambique. 2012;1–94.
8. Marcy SM, Partridge S. Rotavirus Infection. *Netter’s Infectious Disease*. 2011;83(3):1–39.
9. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases*. 2003;9(5):565–72.
10. Acácio S, Nhampossa T, Quintó L, Sacoor C, Kotloff K, Farag T, et al. *International Journal of Infectious Diseases* The role of HIV infection in the etiology and epidemiology of diarrheal disease among children aged 0 – 59 months in Manhiça District , Rural Mozambique. 2018;73:10–7.

11. Groome MJ, Madhi SA. Five-year cohort study on the burden of hospitalisation for acute diarrhoeal disease in African HIV-infected and HIV-uninfected children: Potential benefits of rotavirus vaccine. *Vaccine*. 2012;30(1):173–8.
12. Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Rodriguez WJ, Ross S, Cline WL, et al. Reoviruslike agent in stools: Association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science*. 1974;185:(4156):1049–5.
13. Adams WR, Kraft LM. Epizootic diarrhea of infant mice: Identification of the etiologic agent. *Science*. 1963;3578(141):359–60.
14. Kapikian A, Wyatt R, Dolin R, Thornhill T, Kalica A, Chanock R. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of virology*. 1972;10(5):1075–81.
15. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. VIRUS PARTICLES IN EPITHELIAL CELLS OF DUODENAL MUCOSA FROM CHILDREN WITH ACUTE NON-BACTERIAL GASTROENTERITIS. *The Lancet*. 1973;2(7841):1281–3.
16. Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger JC, Derrick JM. RELATION BETWEEN VIRUSES FROM ACUTE GASTROENTERITIS OF CHILDREN AND NEWBORN CALVES. *The Lancet*. 1974;2(7872):61-3.
17. Davidson GP, Bishop RF, Townley RRW, Holmes IH, Ruck BJ. IMPORTANCE OF A NEW VIRUS IN ACUTE SPORADIC ENTERITIS IN CHILDREN. *The Lancet*. 1975;305(7901):242–2.
18. Linhares a C. Rotavirus infection in Brazil: epidemiology and challenges for its control. *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica*. 2000;16(3):629–46.
19. Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, van Ranst M, Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of Virology*. 2012;157(6):1177–82.
20. Trojnar E, Sachsenröder J, Twardziok S, Reetz J, Otto PH, Johne R. Identification of an avian group a rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *Journal of General Virology*. 2013;94(1):136–42.
21. Mihalov-Kovács E, Gellért Á, Marton S, Farkas SL, Fehér E, Oldal M, et al. Candidate new Rotavirus species in sheltered Dogs, Hungary. *Emerging Infectious Diseases*. 2015;21(4):660–3.
22. Bányai K, Kemenesi G, Budinski I, Földes F, Zana B, Marton S, et al. Candidate new

- rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2017;48:19–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.002>
23. Iturriza Gomara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular Characterization of VP6 Genes of Human Rotavirus Isolates: Correlation of Genogroups with Subgroups and Evidence of Independent Segregation. *J Virol.* 2002;76(13):6596–601.
 24. RCWG_New_Genotypes_20180529 Accessed 23 Dec 2018.
 25. Matthijssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Archives of Virology.* 2008;82:3204–3219.
 26. Matthijssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of Virology.* 2011;156(8):1397–413.
 27. Esona MD, Roy S, Rungrsuriyachai K, Gautam R, Hermelijin S, Rey-Benito G, et al. Molecular characterization of a human G20P[28] rotavirus strain with multiple genes related to bat rotaviruses. *Infection, Genetics and Evolution.* 2018;57:166–70.
 28. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiological reviews.* 1989;53(4):410–449.
 29. Mattion NM, Mitchell DB, Both GW, Estes MK. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology.* 1991;181(1):295–304.
 30. Arias CF, Romero P, Alvarez V, López S. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *Journal of virology.* 1996;70(9):5832–5839.
 31. McClain B, Settembre E, Temple BRS, Bellamy AR, Harrison SC. X-ray Crystal Structure of the Rotavirus Inner Capsid Particle at 3.8 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology.* 2010;397(2):587–99.
 32. Arnoldi F, Campagna M, Eichwald C, Desselberger U, Burrone OR. Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. *Journal of Virology.* 2007;81(5):2128–37.
 33. Estrozi LF, Settembre EC, Goret G, McClain B, Zhang X, Chen JZ, et al. Location of the dsRNA-Dependent Polymerase, VP1, in Rotavirus Particles. *Journal of Molecular Biology.* 2013;425(1):124–32.
 34. McDonald SM, Patton JT. Rotavirus VP2 Core Shell Regions Critical for Viral

- Polymerase Activation. *Journal of Virology*. 2011;85(7):3095–105.
35. McDonald SM, Steger CL, LaConte LE, Pease JB, Boudreaux CE. Group A Rotavirus VP1 Polymerase and VP2 Core Shell Proteins: Intergenotypic Sequence Variation and In Vitro Functional Compatibility. *Journal of Virology*. 2018;93(2):1642–18.
 36. Charpilienne A, Lepault J, Rey F, Cohen J. Identification of Rotavirus VP6 Residues Located at the Interface with VP2 That Are Essential for Capsid Assembly and Transcriptase Activity. *Journal of Virology*. 2002;76(15):782.
 37. Lopez-Guerrero D V., Arias N, Gutierrez-Xicotencatl L, Chihu-Ampan L, González A, Pedroza-Saavedra A, et al. Enhancement of VP6 immunogenicity and protective efficacy against rotavirus by VP2 in a genetic immunization. *Vaccine*. 2018;36(22):307.
 38. McDonald SM, Aguayo D, Gonzalez-Nilo FD, Patton JT. Shared and Group-Specific Features of the Rotavirus RNA Polymerase Reveal Potential Determinants of Gene Reassortment Restriction. *Journal of Virology*. 2009;83(12):61.
 39. Sattar SA, Springthorpe VS, Tetro JA. Rotavirus. In: *Foodborne Disease Handbook: Volume II: Viruses, Parasites, Pathogens, and HACCP*. 2018. p. 50.
 40. Bernstein DI. Rotavirus overview. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2009;28(3 Suppl):S50-3.
 41. Pickering LK, Baker CJ L, SS N. Rotavirus Rotavirus. In: *Rotavirus - Centers for Disease Control and Prevention*. 2008. p. 311–24.
 42. Coffin JM. Retroviridae and their replication. In: *Virology*. 1991. p. 1767–1848.
 43. Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. *Gastroenterology*. 2009;136(6):1939–51.
 44. Arnold MM, Patton JT. Diversity of Interferon Antagonist Activities Mediated by NSP1 Proteins of Different Rotavirus Strains. *Journal of Virology*. 2010;85(5):1970–9.
 45. Harris BD, Schreiter J, Chevrier M, Jordan JL, Walter MR. Human interferon- and interferon- exhibit low potency and low affinity for cell-surface IFNAR and the poxvirus antagonist B18R. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(41):16057–68.
 46. Criglar JM, Hu L, Crawford SE, Hyser JM, Broughman JR, Prasad BV V., et al. A Novel Form of Rotavirus NSP2 and Phosphorylation-Dependent NSP2-NSP5 Interactions Are Associated with Viroplasm Assembly. *Journal of Virology*. 2014;88(2):786–98.
 47. Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(3):1165–

- 77.
48. Gratia M, Vende P, Charpilienne A, Carolina Baron H, Laroche C, Sarot E, et al. Challenging the roles of nsp3 and untranslated regions in rotavirus mRNA translation. *PLoS ONE*. 2016;11(1):145998.
 49. Buccigrossi V, Russo C, Guarino A, De Freitas MB, Guarino A. Mechanisms of antidiarrhoeal effects by diosmectite in human intestinal cells. *Gut Pathogens*. 2017;9(23).
 50. Tian P, Ball JM, Zeng CQ, Estes MK. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *Journal of virology*. 1996;70(10):6973–81.
 51. Taraporewala ZF, Patton JT. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Research*. 2004;101(1):57–66.
 52. Martin D, Charpilienne A, Parent A, Boussac A, D’Autreaux B, Poupon J, et al. The rotavirus nonstructural protein NSP5 coordinates a [2Fe-2S] iron-sulfur cluster that modulates interaction to RNA. *FASEB Journal*. 2013;27(3):1074–83.
 53. Viskovska M, Hu L, Anish R, Hurwitz AM, Palzkill T, Chow D-C, et al. Probing the Sites of Interactions of Rotaviral Proteins Involved in Replication. *Journal of Virology*. 2014;88(21):12866–81.
 54. Holloway G, Johnson RI, Kang Y, Dang VT, Stojanovski D, Coulson BS. Rotavirus NSP6 localizes to mitochondria via a predicted N-terminal α -helix. *Journal of General Virology*. 2015;96(12):3519–24.
 55. Boshuizen JA, Reimerink JHJ, Korteland-van Male AM, van Ham VJJ, Koopmans MPG, Buller HA, et al. Changes in Small Intestinal Homeostasis, Morphology, and Gene Expression during Rotavirus Infection of Infant Mice. *The Journal of Virology*. 2003;77(24):13005–16.
 56. Rodríguez JM, Chichón FJ, Martín-Forero E, González-Camacho F, Carrascosa JL, Castón JR, et al. New Insights into Rotavirus Entry Machinery: Stabilization of Rotavirus Spike Conformation Is Independent of Trypsin Cleavage. *PLoS Pathogens*. 2014;10(5):1004157.
 57. Komoto S, Wakuda M, Ide T, Niimi G, Maeno Y, Higo-Moriguchi K, et al. Modification of the trypsin cleavage site of rotavirus VP4 to a furin-sensitive form does not enhance replication efficiency. *Journal of General Virology*. 2011;92(12):2914–2.
 58. Monnier N, Higo-Moriguchi K, Sun ZY, Prasad B V, Taniguchi K, Dormitzer PR.

- High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. *JOURNAL OF VIROLOGY*. 2006;80(3):1513–23.
59. Zárata S, Cuadras MA, Espinosa R, Romero P, Jua KO, Camacho-nuez M, et al. Interaction of Rotaviruses with Hsc70 during Cell Entry Is Mediated by VP5. *Journal of virology*. 2003;77(13):7254–60.
 60. Liu Y, Huang P, Tan M, Liu Y, Biesiada J, Meller J, et al. Rotavirus VP8*: Phylogeny, Host Range, and Interaction with Histo-Blood Group Antigens. *Journal of Virology*. 2012;86(18):9899–910.
 61. Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, et al. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature*. 2012;485(7397):256–9.
 62. Aoki ST, Settembre EC, Trask SD, Greenberg HB, Harrison SC, Dormitzer PR. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science*. 2009;324(5933):1444–7.
 63. Ludert JE, Michelangeli F, Liprandi F, Esparza J. Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology*. 1987;27(2):95–101.
 64. Wolf M, Vo PT, Greenberg HB. Rhesus Rotavirus Entry into a Polarized Epithelium Is Endocytosis Dependent and Involves Sequential VP4 Conformational Changes. *Journal of Virology*. 2011;85(6):2492–503.
 65. Iša P, Realpe M, Romero P, López S, Arias CF. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology*. 2004;322(2):370–81.
 66. Lawton JA, Estes MK, Prasad BVV. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nature Structural Biology*. 1997;2(2):118–21.
 67. McNeal MM, Bernstein DI. Rotaviruses. In: *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. 2014.
 68. Taniguchi K, Komoto S. Genetics and reverse genetics of rotavirus. *Current Opinion in Virology*. 2012;2(4):399–407.
 69. Ogden KM, Ramanathan HN, Patton JT. Mutational analysis of residues involved in nucleotide and divalent cation stabilization in the rotavirus RNA-dependent RNA polymerase catalytic pocket. *Virology*. 2012;431(1–2):12–20.
 70. Matthijssens J, Miño S, Papp H, Potgieter C, Novo L, Heylen E, et al. Complete molecular genome analyses of equine rotavirus a strains from different continents

- reveal several novel genotypes and a largely conserved genotype constellation. *Journal of General Virology*. 2012;93(4):866–75.
71. Matthijnsens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, et al. Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains. *Journal of Virology*. 2008;82(7):3204–19.
 72. Gómara MI, Green J, Gray J. Methods of rotavirus detection, sero- and genotyping, sequencing, and phylogenetic analysis. *Methods in Molecular Medicine*. 2000;34(34):189–216.
 73. Matsuno S, Hasegawa A, Kalica AR, Kono R. Isolation of a recombinant between simian and bovine rotaviruses. *Journal of General Virology*. 1980;48(1):253–6.
 74. Cook N, Bridger J, Kendall K, Gomara MI, El-Attar L, Gray J. The zoonotic potential of rotavirus. *Journal of Infection*. 2004;48(4):289–302.
 75. Matthijnsens J, Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Current Opinion in Virology*. 2012;2(4):426–33.
 76. Wang YH, Pang BB, Zhou X, Ghosh S, Tang WF, Peng JS, et al. Complex evolutionary patterns of two rare human G3P[9] rotavirus strains possessing a feline/canine-like H6 genotype on an AU-1-like genotype constellation. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2013;16:103–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.016>
 77. Desselberger U, Huppertz HI. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *Journal of Infectious Diseases*. 2011;203(2):188–95.
 78. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Current Opinion in Virology*. 2012;2(4):419–25.
 79. Di Fiore IJM, Holloway G, Coulson BS. Innate immune responses to rotavirus infection in macrophages depend on MAVS but involve neither the NLRP3 inflammasome nor JNK and p38 signaling pathways. *Virus Research*. 2015;2(208):89–97.
 80. Holloway G, Truong TT, Coulson BS. Rotavirus Antagonizes Cellular Antiviral Responses by Inhibiting the Nuclear Accumulation of STAT1 , STAT2 , and NF- κ B . 2009;83(10):4942–51.
 81. Günaydin G, Nordgren J, Svensson L, Hammarström L. Mutations in toll-like receptor 3 are associated with elevated levels of rotavirus-specific IgG antibodies in IgA-

- deficient but not IgA-sufficient individuals. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2014;21(3):298–301.
82. Sadiq A, Bostan N, Yinda KC, Naseem S, Sattar S. Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Reviews in Medical Virology*. 2018;28(6):1–13.
 83. Bernstein DI, Sander DS, Smith VE, Schiff GM, Ward RL. Protection from rotavirus reinfection: 2-Year prospective study. *Journal of Infectious Diseases*. 1991;16(2):277–83.
 84. Offit PA. Host factors associated with protection against rotavirus disease: the skies are clearing. *J Infect Dis*. 1996;174(1):S59-64.
 85. S.E. B, C.D. K, V. P, K.L. W, M. C, M.K. E, et al. Rotavirus antigenaemia and viraemia: A common event? *Lancet*. 2003;
 86. Ramig RF. Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *Journal of Virology*. 2004;
 87. Pickering LK, Baker CJ L, SS N. Rotavirus Rotavirus. In: *Rotavirus - Centers for Disease Control and Prevention*. 2008.
 88. McNeal MM, Bernstein DI. Rotaviruses. In: *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. Springer US; 2014. p. 713–32.
 89. Gran F, Albert D, Sanchez-de-Toledo J, Balcells J, Ferreres JC, Abella R. Heart Transplantation in Pediatric Patients With Pulmonary Hypertension. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2014;
 90. Medici MC, Abelli LA, Guerra P, Dodi I, Dettori G, Chezzi C. Case report: Detection of rotavirus RNA in the cerebrospinal fluid of a child with rotavirus gastroenteritis and meningism. *Journal of Medical Virology*. 2011;
 91. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. DETECTION OF A NEW VIRUS BY ELECTRON MICROSCOPY OF FÆCAL EXTRACTS FROM CHILDREN WITH ACUTE GASTROENTERITIS. *The Lancet*. 1974;1(7849):149–51.
 92. Rubenstein AS, Miller MF. Comparison of an enzyme immunoassay with electron microscopic procedures for detecting rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology*. 1982;15(5):938–4.
 93. World Health Organization. Introduction of rotavirus vaccines. Information for Policy Makers, Programme Managers, and Health Workers. WHO geneva switzerland [Internet]. 2013;1–49. Available from: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/sentinel/rotavirus_intro_guidance_who_july31_2013.pdf

94. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2012;12(2):136–41.
95. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;62 5(Suppl 2):S96–105.
96. Organization WH. report of the meeting on future directions for rotavirus vaccine research in developing countries. *who/V&B/00.23*. 2000.
97. Ward RL, Clark HF, Offit PA. Influence of Potential Protective Mechanisms on the Development of Live Rotavirus Vaccines. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010;202(Suppl):S72-9.
98. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Pérez-Schael I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *The Journal of infectious diseases*. 1996;174(Suppl 1):S65-72.
99. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine - United States, 1998-1999. *Journal of the American Medical Association*. 1999;48(27):577–81.
100. Rotavirus vaccines WHO position paper: January 2013 - Recommendations. *Vaccine*. 2013;31(52):6170–1.
101. Armah GE, Sow SO, Breiman RF, Dallas MJ, Tapia MD, Feikin DR, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2010;376(9741):606–14.
102. Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D, Witte D, Kirsten M, Louw C, et al. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *Malawi Medical Journal*. 2016;28(3):108–14.
103. Burnett E, Jonesteller CL, Tate JE, Yen C, Parashar UD. Global impact of rotavirus vaccination on childhood hospitalizations and mortality from diarrhea. *Journal of Infectious Diseases*. 2017;215(11):1666–72.
104. Mwenda JM, Parashar UD, Cohen AL, Tate JE. Impact of rotavirus vaccines in Sub-Saharan African countries. *Vaccine* [Internet]. 2018;36(47):7119–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.026>
105. Cunliffe NA, Witte D, Ngwira BM, Todd S, Bostock NJ, Turner AM, et al. Efficacy of

- human rotavirus vaccine against severe gastroenteritis in Malawian children in the first two years of life: A randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Vaccine*. 2012;30(Suppl 1):A36-43.
106. Patel M, Pedreira C, De Oliveira LH, Tate J, Leshem E, Mercado J, et al. Effectiveness of Pentavalent Rotavirus Vaccine Against a Diverse Range of Circulating Strains in Nicaragua. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;62(Suppl 2):S127-32.
 107. Bernstein DI. A live attenuated human rotavirus vaccine. *Drugs of Today*. 2007.
 108. Linhares AC, Velázquez FR, Pérez-Schael I, Sáez-Llorens X, Abate H, Espinoza F, et al. Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. *The Lancet*. 2008;371(9619):1181–9.
 109. Steele AD, Neuzil KM, Cunliffe NA, Madhi SA, Bos P, Ngwira B, et al. Human rotavirus vaccine Rotarix™ provides protection against diverse circulating rotavirus strains in African infants: a randomized controlled trial. *BMC Infectious Diseases*. 2012;2(12):213.
 110. Karafillakis E, Hassounah S, Atchison C. Effectiveness and impact of rotavirus vaccines in Europe, 2006-2014. *Vaccine*. 2015;33(18):2097–107.
 111. Bennett A, Pollock L, Jere KC, Pitzer VE, Parashar U, Tate JE, et al. Direct and possible indirect effects of vaccination on rotavirus hospitalisations among children in Malawi four years after programmatic introduction. *Vaccine* [Internet]. 2018;36(47):7142–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.030>
 112. Mpabalwani EM, Simwaka JC, Mwenda JM, Matapo B, Parashar UD, Tate JE. Sustained impact of rotavirus vaccine on rotavirus hospitalisations in Lusaka, Zambia, 2009–2016. *Vaccine* [Internet]. 2018;36(47):7165–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.077>
 113. Tate JE, Ngabo F, Donnen P, Gatera M, Uwimana J, Rugambwa C, et al. Effectiveness of Pentavalent Rotavirus Vaccine under Conditions of Routine Use in Rwanda. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;62(Suppl 2):S208-12.
 114. Gruber JF, Hille DA, Liu GF, Kaplan SS, Nelson M, Goveia MG, et al. Heterogeneity of Rotavirus Vaccine Efficacy among Infants in Developing Countries. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2017;36(1):72–8.
 115. Bhandari N, Rongsen-Chandola T, Bavdekar A, John J, Antony K, Taneja S, et al. Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian infants: A

- randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2014;383(9935):2136–43.
116. Burnett E, Parashar U, Tate J. Rotavirus Vaccines: Effectiveness, Safety, and Future Directions. *Pediatric Drugs* [Internet]. 2018;20(3):223–33. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40272-018-0283-3>
 117. Kirkwood CD, Ma LF, Carey ME, Steele AD. The rotavirus vaccine development pipeline. *Vaccine*. 2017;S0264-410X(17):30410-3.
 118. Luna EJA, Frazzatti-Gallina NM, Timenetsky MCST, Cardoso MRA, Veras MASM, Miraglia JL, et al. A phase I clinical trial of a new 5-valent rotavirus vaccine. *Vaccine*. 2013;31(7):1100–5.
 119. Parrasha UD. Rotavirus Vaccines. In: *The Vaccine Book: Second Edition*. 2016.
 120. Colston JM, Ahmed AMS, Soofi SB, Svensen E, Haque R, Shrestha J, et al. Seasonality and within-subject clustering of rotavirus infections in an eight-site birth cohort study. 2018;146(6):688–97.
 121. Troeger C, Khalil IA, Rao PC, Cao S, Blacker BF, Ahmed T, et al. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatrics*. 2018;172(10):1958–65.
 122. Bányai K, László B, Duque J, Steele AD, Nelson EAS, Gentsch JR, et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era : Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs &. *Vaccine*. 2012;30(Suppl 1):122–30.
 123. Seheri LM, Magagula NB, Peenze I, Rakau K, Ndadza A, Mwenda JM, et al. Rotavirus strain diversity in Eastern and Southern African countries before and after vaccine introduction. *Vaccine* [Internet]. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.068>
 124. Nyaga MM, Tan Y, Seheri ML, Halpin RA, Akopov A, Stucker KM, et al. Whole-genome sequencing and analyses identify high genetic heterogeneity, diversity and endemicity of rotavirus genotype P[6] strains circulating in Africa. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2018;63(2017):79–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.013>
 125. Damanka S, Lartey B, Agbemabiese C, Dennis FE, Adiku T, Nyarko K, et al. Detection of the first G6P[14] human rotavirus strain in an infant with diarrhoea in Ghana. *Virology Journal* [Internet]. 2016;13(1):1–7. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-016-0643-y>
126. Agbemabiese CA, Nakagomi T, Gauchan P, Sherchand JB, Pandey BD, Cunliffe NA, et al. Whole genome characterisation of a porcine-like human reassortant G26P[19] Rotavirus A strain detected in a child hospitalised for diarrhoea in Nepal, 2007. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2017;54:164–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.026>
 127. Martella V, Bányai K, Matthijnsens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology*. 2010;140(3–4):246–55.
 128. Dóró R, László B, Martella V, Leshem E, Gentsch J, Parashar U, et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infection, Genetics and Evolution*. 2014;28:446–61.
 129. Ouermi D, Soubeiga D, Nadembèga WMC, Sawadogo PM, Zohoncon TM. Review Article Molecular Epidemiology of Rotavirus in Children under Five in Africa (2006-2016): A Systematic Review. *Pak J Biol Sci*. 2017;20.(2):59–69.
 130. Koki Ndombo P. Pre-vaccine circulating group a rotavirus strains in under 5 years children with acute diarrhea during 1999-2013 in Cameroon. *Virology: Research and Reviews*. 2018;1(4):1–5.
 131. Kwarteng-Owusu S, Addo-Yobo E, Mwenda JM, Sagoe KW, Damanka S, Lopman B, et al. Rotavirus strain distribution in Ghana pre- and post- rotavirus vaccine introduction. *Vaccine* [Internet]. 2018;36(47):7238–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.01.010>
 132. Griffin DD, Nakagomi T, Hoshino Y, Nakagomi O, Kirkwood CD, Parashar UD, et al. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: Identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6],G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. *Virology*. 2002;294(2):256–69.
 133. Bain R, Cronk R, Wright J, Yang H, Slaymaker T, Bartram J. Fecal Contamination of Drinking-Water in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Medicine*. 2014;11(5):1001644.
 134. Parashar UD, Nelson EAS, Kang G. Diagnosis, management, and prevention of rotavirus gastroenteritis in children. *BMJ (Online)*. 2013;347(f7204):1–19.
 135. Mrukowicz J, Szajewska H, Vesikari T. Options for the Prevention of Rotavirus Disease Other Than Vaccination. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2008;46(Suppl 2):S32-7.

136. Hojsak I. Probiotics in Children: What Is the Evidence? *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*. 2017;20(3):139–46.
137. Salim H, Karyana IPG, Sanjaya-Putra IGN, Budiarsa S, Soenarto Y. Risk factors of rotavirus diarrhea in hospitalized children in Sanglah Hospital, Denpasar: A prospective cohort study. *BMC Gastroenterology*. 2014;14(1):14–54.
138. Wobudeya E, Bachou H, Karamagi CK, Kalyango JN, Mutebi E, Wamani H. Breastfeeding and the risk of rotavirus diarrhea in hospitalized infants in Uganda: A matched case control study. *BMC Pediatrics*. 2011;11(17):1471–2431.
139. Anderson EJ. Prevention and treatment of viral diarrhea in pediatrics. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2010;2(2):205–17.
140. Parashar UD, Alexander JP, Glass RI, Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) C for DC, (CDC) P. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2006;59(33):1074.
141. Dahl RM, Curns AT, Tate JE, Parashar UD. Effect of Rotavirus Vaccination on Acute Diarrheal Hospitalizations Among Low and Very Low Birth Weight US Infants, 2001–2015. *The Pediatric Infectious Disease Journal* [Internet]. 2018;37(8):817–22. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00006454-201808000-00020>
142. Vesikari T. Rotavirus vaccination: A concise review. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(Suppl 5):57–63.
143. UNICEF. One is too many. Ending child deaths from pneumonia and diarrhea. UNICEF. 2016.
144. Carvajal-Vélez L, Amouzou A, Perin J, Maïga A, Tarekegn H, Akinyemi A, et al. Diarrhea management in children under five in sub-Saharan Africa: Does the source of care matter? A Countdown analysis. *BMC Public Health*. 2016;
145. da Silva MFM, Rose TL, Gómez MM, Carvalho-Costa FA, Fialho AM, de Assis RMS, et al. G1P[8] species A rotavirus over 27years - Pre- and post-vaccination eras - in Brazil: Full genomic constellation analysis and no evidence for selection pressure by Rotarix® vaccine. *Infection, Genetics and Evolution*. 2015;30(1):206–18.
146. Nakagomi T, Do LP, Agbemabiese CA, Kaneko M, Gauchan P, Doan YH, et al. Whole-genome characterisation of G12P[6] rotavirus strains possessing two distinct genotype constellations co-circulating in Blantyre, Malawi, 2008. *Archives of Virology*. 2017;162(1):213–26.
147. Jere KC, Chaguzza C, Bar-Zeev N, Lowe J, Peno C, Kumwenda B, et al. Emergence of

- double- and triple-gene reassortant G1P[8] rotaviruses possessing a DS-1-like backbone post rotavirus vaccine introduction in Malawi. *Journal of Virology*. 2017;92(3):e01246-17.
148. Langa JS, Thompson R, Arnaldo P, Resque HR, Rose T, Enosse SM, et al. Epidemiology of rotavirus A diarrhea in Chókwè, Southern Mozambique, from February to September, 2011. *Journal of Medical Virology*. 2016;88(10):1751–8.
 149. João ED, Strydom A, O’Neill HG, Cuamba A, Cassocera M, Acácio S, et al. dren with acute gastroenteritis in Mozambique, 2012-2013: G and P genotypes and phylogenetic aRotavirus A strains obtained from chilnalysis of VP7 and partial VP4 genes. *Archives of Virology* [Internet]. 2018 Jan 20;163(1):153–65. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00705-017-3575-y>
 150. de Deus N, João E, Cuamba A, Cassocera M, Luís L, Acácio S, et al. Epidemiology of rotavirus infection in children from a rural and urban area, in Maputo, Southern Mozambique, before vaccine introduction. *Journal of Tropical Pediatrics*. 2018;64(2):141–5.
 151. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28(3):495–503.
 152. Kumar S, Stecher G, Tamura K, Dudley J. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets Downloaded from. *Mol Biol Evol*. 2016;
 153. Prelog M, Gorth P, Zwazl I, Kleines M, Streng A, Zlamy M, et al. Universal Mass Vaccination Against Rotavirus : Indirect Effects on Rotavirus Infections in Neonates and Unvaccinated Young Infants Not Eligible for Vaccination. 2016;214(4):546–55.
 154. Rahajamanana VL, Raboba JL, Rakotozanany A, Razafindraibe NJ, Andriatahirintsoa EJPR, Razafindrakoto AC, et al. Impact of rotavirus vaccine on all-cause diarrhea and rotavirus hospitalizations in Madagascar. *Vaccine*. 2018;36(47):7198–204.
 155. WHO – UNICEF. Tanzania : WHO and UNICEF estimates of immunization coverage : 2017. WHO and UNICEF Mozambique. 2019.
 156. Gavi-Unicef. Acknowledgments. 2016.
 157. de Deus N, Chilaúle JJ, Cassocera M, Bambo M, Langa JS, Siteo E, et al. Early impact of rotavirus vaccination in children less than five years of age in Mozambique. *Vaccine* [Internet]. 2017;369(47):7205–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.060>
 158. Gastañaduy PA, Steenhoff AP, Mokomane M, Esona MD, Bowen MD, Jibril H, et al.

- Effectiveness of Monovalent Rotavirus Vaccine after Programmatic Implementation in Botswana: A Multisite Prospective Case-Control Study. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;(62):S161–7.
159. Steele AD, Madhi SA, Cunliffe NA, Vesikari T, Phua KB, Lim FS, et al. Incidence of rotavirus gastroenteritis by age in African, Asian and European children: Relevance for timing of rotavirus vaccination. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2016;
 160. Velázquez FR. Protective effects of natural rotavirus infection. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2009;
 161. Fischer TK, Valentiner-Branth P, Steinsland H, Perch M, Santos G, Aaby P, et al. Protective Immunity after Natural Rotavirus Infection: A Community Cohort Study of Newborn Children in Guinea-Bissau, West Africa. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002;
 162. Bar-zeev N, Kapanda L, Tate JE, Jere KC, Iturriza-gomara M, Nakagomi O, et al. Effectiveness of a monovalent rotavirus vaccine in infants in Malawi after programmatic roll-out : an observational and case-control study. 2015;15(April):422–8.
 163. Enweronu-Laryea CC, Armah G, Sagoe KW, Ansong D, Addo-Yobo E, Diamenu SK, et al. Sustained impact of rotavirus vaccine introduction on rotavirus gastroenteritis hospitalizations in children <5 years of age, Ghana, 2009–2016. *Vaccine* [Internet]. 2018;36(47):7131–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.058>
 164. Bennett A, Bar-Zeev N, Cunliffe NA. Measuring indirect effects of rotavirus vaccine in low income countries. *Vaccine* [Internet]. 2016;34(37):4351–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.07.001>
 165. Meta-analysis CA, Mwila-kazimbaya K, Bosomprah S, Simuyandi M, Chisenga CC, Munsaka S. *iMedPub Journals Efficacy and Effectiveness of Rotavirus Vaccine on Incidence of Diarrhoea among*. 2018;1–11.
 166. Lyamuya F, Michael F, Jani B, Fungo Y, Chambo A, Chami I, et al. Trends in diarrhea hospitalizations among infants at three hospitals in Tanzania before and after rotavirus vaccine introduction. *Vaccine*. 2018;36(47):715.
 167. Groome MJ, Zell ER, Solomon F, Nzenze S, Parashar UD, Izu A, et al. Temporal Association of Rotavirus Vaccine Introduction and Reduction in All-Cause Childhood Diarrheal Hospitalizations in South Africa. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;62:S188–95.
 168. Mujuru HA, Yen C, Nathoo KJ, Gonah NA, Ticklay I, Mukaratirwa A, et al. Reduction in Diarrhea- and Rotavirus-related Healthcare Visits among Children <5 Years of Age

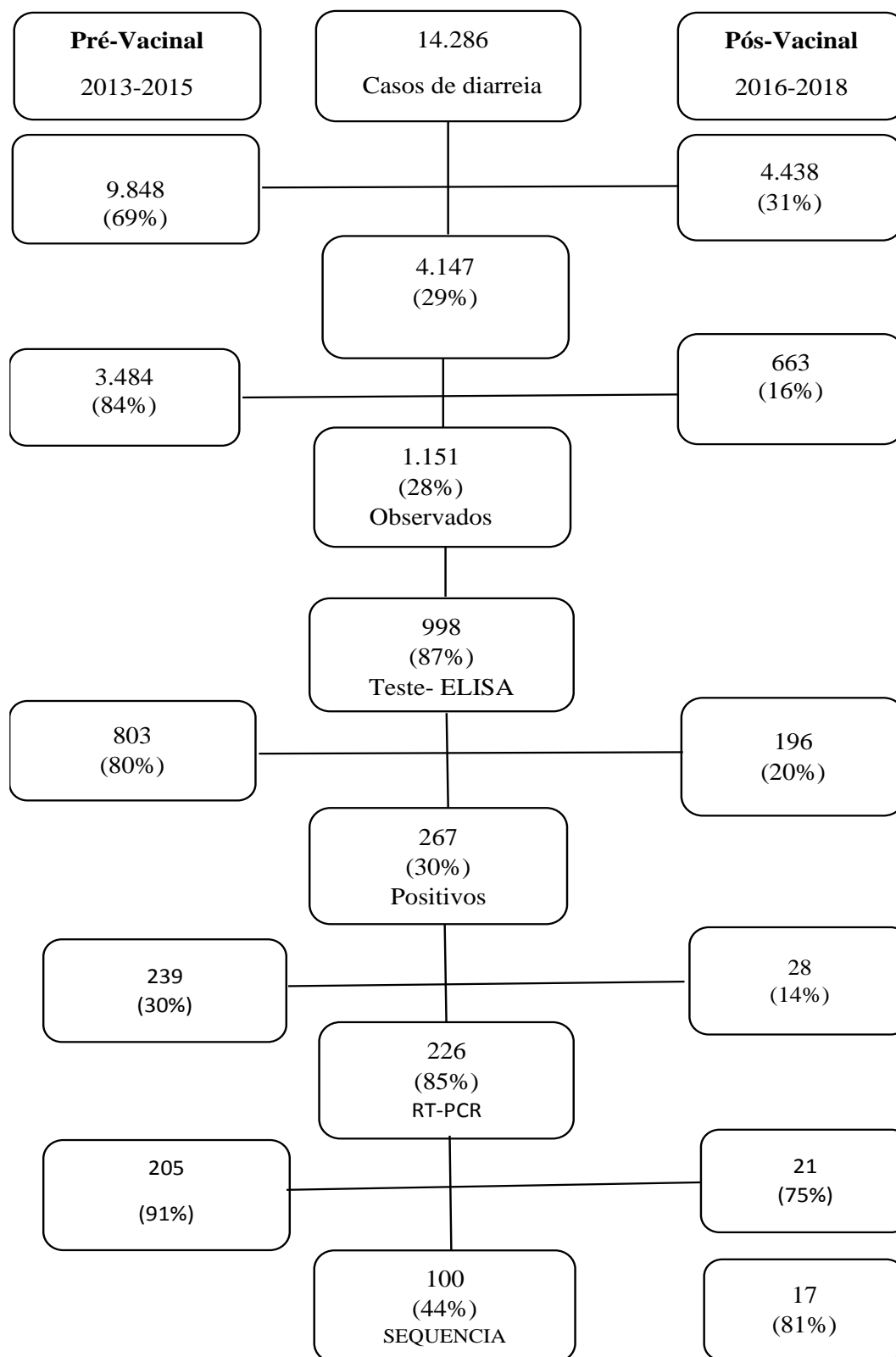
- after National Rotavirus Vaccine Introduction in Zimbabwe. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2017;36(10):995–9.
169. Sungkapalee T, Puntukosit P, Eunsuwan O, Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. Incidence and clinical manifestations of rotavirus infection among children with acute diarrhea admitted at Buri Ram Hospital, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2006;37(6):1125.
 170. Page NA, Seheri LM, Groome MJ, Moyes J, Walaza S, Mphahlele J, et al. Temporal association of rotavirus vaccination and genotype circulation in South Africa: Observations from 2002 to 2014. *Vaccine* [Internet]. 2017;36(47):723. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.062>
 171. Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SCF, Barros VCF, Fontes PB, Salustino EF, et al. Predominance of in a Vaccinated. *Emerging Infectious Diseases*. 2007;13(10):10–2.
 172. Grimwood K, Kirkwood CD. Human rotavirus vaccines: too early for the strain to tell. *The Lancet*. 2008;371(9619):1144–5.
 173. Matthijssens J, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K, Rahman M, et al. Rotavirus disease and vaccination: Impact on genotype diversity. *Future Microbiology*. 2009;4(10):1303–16.
 174. Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Ramirez S, Lo Biundo C, Colomba C, et al. Heterogeneity and Temporal Dynamics of Evolution of G1 Human Rotaviruses in a Settled Population. *Journal of Virology*. 2006;80(21):107.
 175. Araújo IT, Ferreira MSR, Fialho AM, Assis RM, Cruz CM, Rocha M, et al. Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(5):1999–2001.
 176. Armah GE, Steele AD, Esona MD, Akran VA, Nimzing L, Pennap G. Diversity of rotavirus strains circulating in west Africa from 1996 to 2000. *The Journal of infectious diseases*. 2010;2012(S1):S64–71.
 177. Moussa A, Ben Hadj Fredj M, BenHamida-Rebaï M, Fodha I, Boujaafar N, Trabelsi A. Phylogenetic analysis of partial VP7 gene of the emerging human group A rotavirus G12 strains circulating in Tunisia. *Journal of Medical Microbiology*. 2017;66(2):112–8.
 178. Estatística IN de. Mozambique Demographic and Health Survey 2011. Calverton, Maryland, USA: MISAU, INE e ICFI. 2011.
 179. Page NA, Seheri LM, Groome MJ, Moyes J, Walaza S, Mphahlele J, et al. Temporal

association of rotavirus vaccination and genotype circulation in South Africa:
Observations from 2002 to 2014. Vaccine. 2018;

ANEXOS

ANEXO 1. FLUXOGRAMA DE SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Fluxograma de seleção das amostras



ANEXO 2 . DOCUMENTOS DO PERIODO PRÉ- VACINA1



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE IRB00002657

Exma Senhora
Dr^a Beatriz Elias
UEM- Faculdade de Medicina

Ref: 172/CNBS/12

Data 08 de Maio de 2012

Assunto: *Aprovação do Protocolo "Ocorrência de Rotavírus em Crianças de 3-59 meses com Diarreia Aguda atendidas nas urgências de Pediatria do Hospital Central de Maputo."*

O Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou as correcções efectuadas no protocolo intitulado: "*Ocorrência de Rotavírus em Crianças de 3-59 meses com Diarreia Aguda atendidas nas urgências de Pediatria do Hospital Central de Maputo.*" Sobre o mesmo chegou a seguinte conclusão:

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

Contudo recomenda aos investigadores que o mantenham informado do decurso do estudo.

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

Sem mais de momento as nossas cordiais saudações.



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



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE
IRB00002657

Exma Senhora
Dr^a Beatriz José Elias
HCM

Ref: 317/CNBS/13

Data 05 de Novembro de 2013

Assunto: Parecer do Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS) sobre o estudo:
"Ocorrência de Rotavirus em crianças de 3-59 meses com Diarreia Aguda atendidas no Departamento de Pediatria do Hospital Central de Maputo"

O Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS) fez a revisão do pedido de acréscimo ao protocolo do estudo intitulado: *"Ocorrência de Rotavirus em crianças de 3-59 meses com Diarreia Aguda atendidas no Departamento de Pediatria do Hospital Central de Maputo"*, na sua versão de Março de 2013, conforme os requisitos da Declaração de Helsínquia,

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

Todavia, o CNBS recomenda aos investigadores que o mantenham informado do decurso do estudo.

Com as nossas mais cordiais saudações.



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



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE

NÚMERO DO QUESTIONÁRIO: |__|__||__|__|

DATA DA ENTREVISTA: ____/____/____

| I. DADOS DA UNIDADE SANITARIA E DA CRIANÇA | | | | | |
|---|---|--|--|---|--|
| 1 Data da entrevista: ____ / ____ / ____ ____ D D M M A A A A | | 2a NID do paciente: ____ / ____ 2b Número de estudo: ____ - ____ - ____ ____ 2c NIA: ____ - ____ - ____ ____ | | | |
| 3 Nome do Hospital: | | | 4 Nome da mãe/cuidador: | | |
| 5 Contacto da mãe/cuidador: | | | 6 Nome da criança : | | |
| 7 Província: | | | 8 Cidade: | | |
| 9 Distrito: | | | 10 Local de residência: | | |
| 11 Tratado na: | 1 | Enfermaria | 2 | Banco de Socorros /ICD (com fluídos IV) | |
| 12 Data de admissão: ____ / ____ / ____ ____ D D M M A A A A | | | 13 Hora aproximada de admissão: ____ : ____ H H M M | | |
| 14 Idade da criança em meses: ____ | | 15 Data de nascimento da criança: ____ / ____ / ____ D D M M A A A A | | | |
| 16 Sexo: | M | M as cul in o | F | Feminino | |
| 17 A criança é prematura? | 1 | Sim | 2 | Não | 18 Peso da criança ao nascer (gramas): |

| | | | | | | | | | |
|--|-----------------|------------------------------|----|-------------------|----------------------------------|-----|---|---------------------|---|
| 19 | Peso actual: | ___ ___ . ___ Quilogramas | 20 | Altura actual: | ___ ___ ___ centímetros | 21 | Perímetro braquial: | ___ ___ centímetros | |
| 22 Data de início dos sintomas: ___ ___ / ___ ___ / ___ ___ ___ ___ D D M M A A A A | | | | | | | | | |
| 23 Quantos dias antes da admissão a criança começou com diarreia? | | | | | | | ___ ___ dias (digite 99 se Não sabe) | | |
| 24 Número de episódios de diarreia em 24 horas? | | | | | | | ___ ___ episódios (digite 99 se Não sabe) | | |
| 25 A criança teve vômito? (Se Não ou Não sabe saltar para P28) | | | | | 1 | Sim | 2 | Não | |
| 26 Quantos dias antes da admissão a criança começou com vômito? | | | | | | | ___ ___ dias (digite 99 se Não sabe) | | |
| 27 Número de episódios de vomito em 24 horas? | | | | | | | ___ ___ episódios (digite 99 se Não sabe) | | |
| 28 Antes de vir ao hospital criança recebeu reidratação oral (SRO)? | | | | | 1 | Sim | 2 | Não | |
| 29 Na chegada/admissão (ex: antes da reidratação), Qual era o estado geral da criança? | | | | 1 | Bem, alerta (Satisfatório) | 2 | Inquieto, irritável (Moderado) | 3 | Letárgica ou inconsciente |
| 30 Na admissão ou durante o internamento a criança teve olhos encovados? | | | | | 1 | Sim | 2 | | |
| 31 Antes da admissão (ex: antes da reidratação) qual é o estado de hidratação? | | | | 1 | Bebia normalmente, sem sede | 2 | Sedente, bebeu avidamente | 3 | Bebia mal, não era capaz de beber |
| 32 Na chegada/admissão (ex: antes da reidratação), descrever o turgor da pele quando beliscar o abdómen? | | | | 1 | Volta rapidamente (ex: imediata) | 2 | Volta lentamente (ex: 1-2 segundos) | 3 | Volta muito lentamente (ex: mais de 2 segundos) |
| 33 Nível de desidratação | | | | 1 | Severa/Grave | 2 | Moderada | 3 | Choque |
| 34 Durante a hospitalização a criança recebeu tratamento oral? | | | | | 1 | Sim | 2 | Não | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|---|-------------------|--|----------------------|--|----------|---|------------|---|---------------------------|---|--------|
| 35 A criança teve historia de febre? | | | | 1 | Sim | 2 | Não | | | | | | |
| 36 A temperatura mais alta que a criança apresentou? | | | | ____ . ____° Centigrados (digite 99 se Não sabe) | | | | | | | | | |
| 37 A criança recebeu antibióticos recentemente? | | | | 1 | Sim | 2 | Não | | | | | | |
| 38 Por quanto tempo a criança tomou antibióticos? | | 1 | Menos de 7 dias | 2 | Mais de 7 dias | 9 | Não sabe | | | | | | |
| 39 Se tomou antibióticos, especifique quais: | | | | | | | | | | | | | |
| 40 A criança foi hospitalizada por diarreia anteriormente? (sem contar como esta)? | | | | 1 | Sim | 2 | Não | | | | | | |
| 41 Se Sim, quantas vezes nos últimos 12 meses? | | | | ____ digite 88 se Não foi hospitalizado; digite 99 se Não sabe | | | | | | | | | |
| 42 A criança apresenta alguma condição crônica? | | 1 | Sim, especifique: | | | 2 | Não | | | | | | |
| 43 A criança tem malnutrição? | | 1 | Sim | 2 | Não | 99 | Não sabe | | | | | | |
| 44 A criança tem malária? | | 1 | Sim | 2 | Não | 99 | Não sabe | | | | | | |
| 45 A criança tem pneumonia? | | 1 | Sim | 2 | Não | 99 | Não sabe | | | | | | |
| 46 A amostra de fezes foi colhida? | | 1 | Sim | 2 | Não (passa para P50) | 47 Data de colheita: ____ / ____ / ____ D D M M A A A A | | | | | | | |
| 48 Características das fezes? | | 1 | Aquosa | 2 | Semi-pastosa | 3 | Pastoso | 4 | Com sangue | 5 | Em forma de água de arroz | 6 | Mucosa |

III. CARTÃO DE VACINAÇÃO / REGISTO HISTÓRICO DE VACINAÇÃO

Por favor veja o cartão de vacinação da criança. Se o cartão de vacinação da criança estiver disponível, use-o para documentar a história de vacinação abaixo. Se o cartão de vacinação existe, mas não está disponível/presente no momento da entrevista, solicitar o pai / cuidador para que traga o cartão para o hospital e completar o histórico de vacinação mais tarde ou completar a história de vacinação usando o

| | | | | | | | | | | | |
|--|--|---|---|-----|---------------------|---|----------------------|---|----|----------|--|
| <i>registro de vacinação no centro de saúde onde a criança foi vacinada. Faça uma cópia do cartão de vacinação.</i> | | | | | | | | | | | |
| 49 A criança já foi vacinada? | | | 1 | Sim | | 2 | Não (passe para P53) | | 99 | Não sabe | |
| 50 Onde a criança recebeu a vacinação (circule em TODOS que se apliquem e especifique o LOCAL onde a vacina foi recebida?) | | 1 | Centro de Saúde ou Clínica Especifique (Nome do Centro, Vila, Distrito): | | | | | | | | |
| | | 2 | Hospital: Especifique (Nome Hospital, Distrito): | | | | | | | | |
| | | 3 | Outro; Especifique: | | | | | | | | |
| | | 9 | Não sabe / Desconhecido | | | | | | | | |
| 51 Qual foi a fonte de informação da vacinação? | | | | 1 | Cartão de vacinação | | 2 | Registos clínicos | | | |
| 52 A criança recebeu as seguintes vacinas? | | | | | | | | | | | |
| a. Rotavirus ? | | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | Data da 1 dose: ___ ___ / ___ ___ / ___ ___ ___ ___ D D M M A A A A | | | |
| | | | | | | | | Data da 2 dose: ___ ___ / ___ ___ / ___ ___ ___ ___ ___ D D M M A A A A | | | |
| b. Polio oral (ao nascer)? | | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | Data da recepção: ___ ___ / ___ ___ / ___ ___ ___ ___ D D M M A A A A | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| c. Polio oral? | | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | Data da 1 dose: ___ ___ / ___ ___ / ___ ___ ___ ___ D D M M A A A A | | | |
| | | | | | | | | Data da 2 dose: ___ ___ / ___ ___ / ___ ___ ___ ___ D D M M A A A A | | | |
| d. Pentavalente? | | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | Data da 1 dose: ___ ___ / ___ ___ / ___ ___ ___ ___ D D M M A A A A | | | |
| | | | | | | | | Data da 2 dose: ___ ___ / ___ ___ / ___ ___ ___ ___ D D M M A A A A | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--------------|---|----------------------|--------------------------------|-------------------|---|----------|---|---|---|------|
| | | | | | | | | | | Data da 3 dose: ____ / ____ / ____ ____ D D M M A A A A | | |
| e. Pneumococo? | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | | | | Data da 1 dose: ____ / ____ / ____ ____ D D M M A A A A Data da 2 dose: ____ / ____ / ____ ____ D D M M A A A A Data da 3 dose: ____ / ____ / ____ ____ D D M M A A A A | | |
| f. Sarampo? | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | | | | Data da recepção: ____ / ____ / ____ ____ D D M M A A A A | | |
| IV. ESTADO DE HIV | | | | | | | | | | | | |
| 53 Qual é o estado de HIV da criança? | 1 | Positivo | 2 | Negativo | 3 | Indeterminado | 4 | Não sabe | | | | |
| <i>Se HIV negativo: (Se a criança é HIV negativo, passe para P60)</i> | | | | | | | | | | | | |
| 54 A quantos meses foi diagnosticada? | ____ | | | | 55 CD4 (cel/mm ³)? | _____ | | | | | | |
| 56 A criança está em TARV? | 1 | Sim | 2 | Não (passe para P60) | 3 | Não sabe | | | | | | |
| 57 Se em TARV, data de início de tratamento: | ____ / ____ / _____ D D M M A A A A | | | | | | | | | | | |
| 58 Se em TARV, especifique regime: | | | | | | | | | | | | |
| 59 Estado de HIV da mãe? | 1 | HIV positivo | 2 | HIV negativo | 3 | Não sabe | | | | | | |
| 60 Se HIV positivo, fez PTV? | 1 | Sim | 2 | Não | 3 | Não sabe | | | | | | |
| V. SITUAÇÃO FAMILIAR | | | | | | | | | | | | |
| 61 Qual é a relação com a criança? | 1 | Mãe | 2 | Pai | 3 | Outros familiares | 4 | Guardião | | | | |
| 62 Quem cuida da criança? | 1 | Mãe | 2 | Pai | 3 | Tio/Tia | 4 | Avós | 5 | Irmão/Irmã | 6 | Babá |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|--------------------------|---|-----------------------------|---|-------------------|----------------------|--------------------------|-----|---------------------|-----|----------------|----------|----------|
| 63 Sustento da família: | | | | | | | | | | | | | | |
| a Pai trabalha | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | b Mãe trabalha | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | |
| c Auto-emprego (pai) | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | d Auto-emprego (mãe) | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | |
| e Agricultura | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | f Avós trabalham | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | |
| g Tio/Tia trabalham | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | h Outro | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | |
| 64 No total, quantas pessoas incluindo a criança, regularmente dormem na casa de noite na casa onde a criança morra? | | | | | | | | | | | | | | |
| 65 CONTADO OS CASOS, quantas crianças abaixo dos 5 anos de idade (ex: permanecem pelo menos 4 noites por semana) na residência? | | | | | | | | | | | | | | |
| 66 Qual é a idade (em anos) da mãe ou acompanhante da criança no momento da visita ao hospital? (digite 99 se Não sabe) | | | | | | | | | | | | | | |
| 67 Qual é o grau alto de escolaridade da mãe ou acompanhante? | 1 | Não estudou | 2 | Primário | 3 | Secundário | 4 | Técnico | 5 | Universitário/acima | | | | |
| 68 Estado marital da mãe? | 1 | Casada | 2 | Solteira | 3 | Divorciada | 4 | União de facto | 5 | Viúvo | | | | |
| 69 Qual é o grau alto de escolaridade do pai? | 1 | Não estudou | 2 | Primário | 3 | Secundário | 4 | Técnico | 5 | Universitário/acima | | | | |
| 70 Tem electricidade na residência? | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | | | | | | | | |
| 71 Tipo de habitação? | 1 | Casa de caniço | 2 | Casa de barro | 3 | Casa de alvenaria | | | | | | | | |
| 72 Qual é a fonte de água para beber? | 1 | Canalizada na casa/pátio | 2 | Torneira pública/fontenaria | 3 | Furo | 4 | Poço tapado | 5 | Poço aberto | 6 | Rio/Lago/Lagoa | 99 | Não sabe |
| 73 A água é tratada | 1 | Sim, Fervura | 2 | Sim, Cloração | 3 | Sim, Filtração | 4 | Sim, outro, especifique: | 5 | Não | 9 | Não sabe | | |

| | | | | | | |
|---|---|---------------------------|---|------------------|--------|------------------------------|
| 74 Quais dos seguintes itens tem na sua casa? | | | | | | |
| a. rádio | 1 | Sim | 2 | Não | 99 | Não sabe |
| b. televisão | 1 | Sim | 2 | Não | 99 | Não sabe |
| c. geleira | 1 | Sim | 2 | Não | 99 | Não sabe |
| d. colchão | 1 | Sim | 2 | Não | 99 | Não sabe |
| e. bicicleta | 1 | Sim | 2 | Não | 99 | Não sabe |
| f. motorizada | 1 | Sim | 2 | Não | 99 | Não sabe |
| g. carro | 1 | Sim | 2 | Não | 99 | Não sabe |
| h. celular | 1 | Sim | 2 | Não | 99 | Não sabe |
| i. computador | 1 | Sim | 2 | Não | 99 | Não sabe |
| 75 Tipo de alimentação da criança? | 1 | Leite materno | 2 | Leite artificial | 3 | Outro (diversificado/sólido) |
| 76 Idade de desmame em meses: ____ ____ (Se Não sabe, digite 99). | | | | | | |
| VI. FACTORES DE RISCO E EPIDEMIOLOGICOS | | | | | | |
| 77 Na residência houve algum caso de diarreia nos últimos 7 dias? | 1 | Sim | 2 | Nã o | 9 9 | Não sabe |
| 78 A criança teve contacto com alguém com diarreia nos últimos 7 dias? | 1 | Sim, Especifique quem: | 2 | Nã o | 9 9 | Não sabe |
| 79 A criança participou de alguma festa ou evento social nos últimos 7 dias? | 1 | Sim, Especifique qual: | 2 | Nã o | 9 9 | Não sabe |
| 80 A criança esteve em algum Mercado ou centro comercial nos últimos 7 dias antes de adoecer? | 1 | Sim, Especifique onde: | 2 | Nã o | 9 9 | Não sabe |
| 81 A criança viajou para for a da vila/cidade nos últimos 7 dias antes de adoecer? | 1 | Sim, Especifique onde: | 2 | Nã o | 9 9 | Não sabe |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|---|----------|---|-------|-----|---------------------------------------|--|-----------|----|-------------|---------|--------|----------|------------------------|
| 82 A criança tem contacto com animais? | | | | | 1 | Sim | | | | | 2 | Nã o | 9 9 | Não sabe | |
| 83 Se Sim, que animais? | | 1 | Cã o | 2 | Gato | 3 | Vaca | 4 | Porc o | 5 | Cabrit o | 6 | Rato | 7 | Outro, Especifique: |
| VII. ALTA E DESFECHO | | | | | | | | | | | | | | | |
| 84 Data da alta: ____ / ____ / ____ D D M M A A A A | | | | | | | | 85 Hora aproximada da alta: ____ : ____ H H M M | | | | | | | |
| 86 Desfecho: | | 1 | Melhorou | 2 | Óbito | 3 | Transferido para outro hospital | 4 | Abandono | 99 | Não sabe | | | | |

Termo de consentimento informado

Alguns estudos determinaram a frequência das infecções por rotavírus em Moçambique. Contudo estas tentativas são escassas e foram efectuadas a algum tempo. O objectivo desta proposta de pesquisa é de avaliar a magnitude da diarreia por rotavírus em crianças com diarreia aguda, internadas na Pediatria do Hospital Central de Maputo.

Os procedimentos incluirão a selecção de uma amostra populacional, de entre as crianças acima referidas, cujos pais ou tutores adultos decidirem que as suas crianças entrem para o estudo. Serão examinadas laboratorialmente as fezes para o despiste da diarreia por rotavírus, utilizando um teste já padronizado. Paralelamente será administrado um questionário para captarem se aspectos que podem estar relacionados com casos de diarreias nas crianças.

Os resultados deste estudo serão mantidos confidenciais e quando divulgados preservarão o anonimato dos participantes.

O participante terá acesso à informação que lhe diz respeito. Os desconfortos próprios do manuseamento das crianças serão mínimos pois a componente biológica que será aproveitada durante a dejectação normal.

Os riscos à saúde serão controlados com assepsia própria da recolha da amostra. Os benefícios incluem o diagnóstico definitivo correcto com a respectiva terapêutica adequada. Os pesquisadores responsáveis pelo projecto de pesquisa são:

Consentimento informado

Através de um Termo de Consentimento informado, declaro que fui explicado, de forma clara e detalhada, sobre as justificativas, objectivos, os procedimentos, os riscos, os desconfortos e benefícios a que minha criança será submetida ao participar na pesquisa. Fui igualmente informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a dúvidas acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- Da liberdade que tenho de retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuação do tratamento da minha criança;
- Da segurança de que será mantido o carácter confidencial das informações a respeito da minha criança e da minha família;
- Da disponibilidade de tratamento médico a minha criança;

- De que, se existirem gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Assim, assino:

Data: ____/____/20____

Assinatura da Investigadora

Data: ____/____/20____

ANEXO 3 . DOCUMENTOS DO PERÍDO PÓS VACINAL



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

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 serão 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 1 colher de sopa (10 ml) e uma zaragatoa rectal**. 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. Judite Salência**, médica e clínica do estudo (**Tel:840514553**), 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 com a participação do meu filho/a neste estudo como sujeito voluntário e levarei uma cópia desta folha de informação para guardar.
- 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.
- Não 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.

| | | |
|------|----------------------------|--------------------|
| Data | 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 | Nome do investigador/técnico |
|------|------------------------------|

Assinatura

Formulário de coleta de dados pós-vacina

| | | | | | |
|--|--|--|--|---|---|
|  | | Instituto Nacional de Saúde Departamento de Pesquisa | |  | |
| Revisão: 0.4 Página 1 de 4 | | Formulário de Recolha de Dados | | CRF_VINADIA_01 | |
| I. DADOS DA UNIDADE SANITÁRIA E DA CRIANÇA | | | | | |
| 1 Data da entrevista: ___/___/___ D D M M A A A A | | | 2a NID do paciente: _____/_____ 2b Número de estudo: _____-_____-_____ 2c NIA: _____-_____-_____ | | |
| 3 Nome do Hospital: | | | 4 Nome da mãe/cuidador: | | |
| 5 Contacto da mãe/cuidador: | | | 6 Nome da criança: | | |
| | | | 7 Apelido da criança: | | |
| 8 Província: | | | 9 Cidade: | | |
| 10 Distrito: | | | 11 Local de residência: | | |
| 12 Tratado na: | | 1 | Enfermaria | 2 | Banco de Socorros /ICD (com fluidos IV) |
| 13 Data de admissão: ___/___/___ D D M M A A A A | | | 14 Hora aproximada de admissão: ___:___:___ H H M M | | |
| 15 Idade da criança em meses: ____ | | | 16 Data de nascimento da criança: ___/___/___ D D M M A A A A | | |
| 17 Sexo: | | M | Masculino | F | Feminino |
| 18 A criança é prematura? | | 1 | Sim | 2 | Não |
| 19 Peso da criança ao nascer (gramas): | | | | | |
| 20 Peso actual: | | ___ Quilogramas | | 21 Altura actual: | ___ centímetros |
| | | | | 22 Perímetro braquial: | ___ centímetros |
| 23 Tratamento | | 1 | Oral | 2 | Intravenoso |
| | | 3 | Oral e Intravenoso | 4 | Outros: |
| II. HISTÓRICO CLÍNICO DA CRIANÇA | | | | | |
| 24 Data de início da diarreia: ___/___/___ D D M M A A A A | | | | | |
| 25 A criança tem diarreia aguda? <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 99-Não sabe | | | | | |
| 25a Se sim, Duração de diarreia: _____ (Dias) | | 25b Número de episódios de diarreia em 24 horas? _____ | | | |
| 26 A criança tem diarreia crónica? <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 99-Não sabe | | | | | |
| 26a Se sim, Duração de diarreia: _____ (Dias) | | 26b Número de episódios de diarreia em 24 horas? _____ | | | |
| 27 A criança tem diarreia com sangue? <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 99-Não sabe | | | | | |
| 28 A criança teve vômito? (Se Não ou Não sabe saltar para P31) | | 1 | Sim | 2 | Não |
| 29 Quantos dias antes da admissão a criança começou com vômitos? | | ___ dias (digite 99 se Não sabe) | | | |
| 30 Número de episódios de vômito em 24 horas? | | ___ episódios (digite 99 se Não sabe) | | | |
| 31 Antes de vir ao hospital criança recebeu reidratação oral (SRO)? | | 1 | Sim | 2 | Não |
| | | 99 | Não sabe | | |
| 32 Na chegada/admissão (ex: antes da reidratação), Qual era o estado geral da criança? | | 1 | Bem, alerta (Satisfatório) | 2 | Inquieto, irritável (Moderado) |
| | | 3 | Letárgica ou inconsciente | 99 | Não sabe |
| 32 Na admissão ou durante o internamento a criança teve olhos encovados? | | 1 | Sim | 2 | Não |
| | | 99 | Não sabe | | |
| 33 Antes da admissão (ex: antes da reidratação) qual é o estado de hidratação? | | 1 | Bebia normalmente, e, sem sede | 2 | Sedente, bebeu avidamente |
| | | 3 | Bebia mal, não era capaz de beber | 99 | Não sabe |
| 34 Na chegada/admissão (ex: antes da reidratação), descrever o turgor da pele quando beliscar o abdómen? | | 1 | Volta rapidamente (ex: imediatamente) | 2 | Volta lentamente (ex: 1-2 segundos) |
| | | 3 | Volta muito lentamente (ex: mais de 2 segundos) | 99 | Não sabe |
| 35 Nível de desidratação | | 1 | Severa/Grave | 2 | Moderada |
| | | 3 | Choque | 4 | Nenhum |
| 36 A criança teve história de febre? | | 1 | Sim | 2 | Não |
| | | 99 | Não sabe | | |
| 37 A temperatura mais alta que a criança apresentou? | | ___ ° Centígrados (digite 99 se Não sabe) | | | |
| 38 A criança recebeu antibióticos recentemente? | | 1 | Sim | 2 | Não |
| | | 99 | Não sabe | | |
| 39 Por quanto tempo a criança tomou antibióticos? | | 1 | Menos de 7 dias | 2 | Mais de 7 dias |
| | | 99 | Não sabe | 88 | Sem antibióticos |
| 40 Se tomou antibióticos, especifique quais: | | | | | |
| 41 A criança foi hospitalizada por diarreia anteriormente? (sem contar como esta)? | | 1 | Sim | 2 | Não |
| | | 99 | Não sabe | | |
| 42 Se Sim, quantas vezes nos últimos 12 meses? | | ___ digite 88 se Não foi hospitalizado; digite 99 se Não sabe | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|-------------------|---|----------------------|---|--|----|------------|---|---------------------------|---|--------|
| 43 A criança apresenta alguma condição crónica? | 1 | Sim, especifique: | | | 2 | Não | 99 | Não sabe | | | | |
| 44 A criança tem malnutrição? | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | | | | | | |
| 45 A criança tem malária? | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | | | | | | |
| 46 A criança tem pneumonia? | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | | | | | | |
| 47 A amostra de fezes foi colhida? | 1 | Sim | 2 | Não (passa para P49) | | 48 Data de colheita: ____/____/____ D D M M A A A A | | | | | | |
| 49 Características das fezes? | 1 | Aquosa | 2 | Semi-pastosa | 3 | Pastoso | 4 | Com sangue | 5 | Em forma de água de arroz | 6 | Mucosa |
| 50 Data de envio da amostra ao laboratório: ____/____/____ D D M M A A A A | | | | | | | | | | | | |

III. CARTÃO DE SAÚDE DA CRIANÇA / REGISTO HISTÓRICO DE VACINAÇÃO

Por favor veja o cartão de saúde da criança. Se o cartão estiver disponível, use-o para documentar a história de vacinação abaixo. Se o cartão de saúde existe, mas não está disponível/presente no momento da entrevista, solicitar o pai / cuidador para que traga o cartão para o hospital e completar o histórico de vacinação mais tarde ou completar a história de vacinação usando o registo de vacinação no centro de saúde onde a criança foi vacinada. Faça uma cópia do cartão de saúde da criança.

| | | | | | | | | | |
|--|----|---|---|----------------------|----|---|----|----------|--|
| 51 A criança já foi vacinada? | 1 | Sim | 2 | Não (passe para P53) | 99 | Não sabe | | | |
| 52 Onde a criança recebeu a vacinação (circule em TODOS que se apliquem e especifique o LOCAL onde a vacina foi recebida?) | 1 | Centro de Saúde ou Clínica Especifique (Nome do Centro, Vila, Distrito): | | | | | | | |
| | 2 | Hospital: Especifique (Nome Hospital, Distrito): | | | | | | | |
| | 3 | Outro; Especifique: | | | | | | | |
| | 4 | Todas opções acima | | | | | | | |
| | 99 | Não sabe / Desconhecido | | | | | | | |
| 53 Qual foi a fonte de informação da vacinação? | 1 | Cartão de saúde | 2 | Registos clínicos | 3 | Verbal | 99 | Não sabe | |
| 54 Cópia de cartão de vacinação feita? | 1 | Sim | 2 | Não | 99 | Não sabe | | | |
| 55 A criança recebeu as seguintes vacinas? | | | | | | | | | |
| a. Rotarix / Rotavirus? | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | | | |
| | | | | | | Data da 1 dose: ____/____/____ D D M M A A A A | | | |
| | | | | | | Data da 2 dose: ____/____/____ D D M M A A A A | | | |
| b. Pólio oral (ao nascer)? | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | | | |
| | | | | | | Data da recepção: ____/____/____ D D M M A A A A | | | |
| c. Pólio oral? | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | | | |
| | | | | | | Data da 1 dose: ____/____/____ D D M M A A A A | | | |
| | | | | | | Data da 2 dose: ____/____/____ D D M M A A A A | | | |
| | | | | | | Data da 3 dose: ____/____/____ D D M M A A A A | | | |
| d. Pentavalente? | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | | | |
| | | | | | | Data da 1 dose: ____/____/____ D D M M A A A A | | | |
| | | | | | | Data da 2 dose: ____/____/____ D D M M A A A A | | | |
| | | | | | | Data da 3 dose: ____/____/____ D D M M A A A A | | | |
| e. Pneumococo? | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | | | |
| | | | | | | Data da 1 dose: ____/____/____ D D M M A A A A | | | |
| | | | | | | Data da 2 dose: ____/____/____ D D M M A A A A | | | |
| | | | | | | Data da 3 dose: ____/____/____ D D M M A A A A | | | |
| f. Sarampo? | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | | | |
| | | | | | | Data da recepção: ____/____/____ D D M M A A A A | | | |
| g. Vacina Injectada contra a Poliomielite? | 1 | Sim | 2 | Não | 9 | Não sabe | | | |
| | | | | | | Data da recepção: ____/____/____ D D M M A A A A | | | |

IV. ESTADO DE HIV

| | | | | | | | | | |
|---|---|----------|---|----------|---|---------------|----|----------|--|
| 56 Qual é o estado de HIV da criança? (Se a criança é HIV negativo, passe para P57) | 1 | Positivo | 2 | Negativo | 3 | Indeterminado | 99 | Não sabe | |
| 57 Estado de HIV da mãe? | 1 | Positivo | 2 | Negativo | 3 | Indeterminado | 99 | Não sabe | |
| 58 Se Mãe HIV positivo, fez PTV? | 1 | Sim | 2 | Não | 3 | Não sabe | | | |

| VI. FACTORES DE RISCO E EPIDEMIOLÓGICOS | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|-----|---|------|---|------------------------|---|-------|-----|---------|----|----------|---|---------------------|
| 75 Na residência houve algum caso de diarreia nos últimos 7 dias? | | | | | 1 | Sim | | 2 | Não | | 99 | Não sabe | | |
| 76 A criança participou de alguma festa ou evento social nos últimos 7 dias? | | | | | 1 | Sim, Especifique qual: | | 2 | Não | | 99 | Não sabe | | |
| 77 A criança tem contacto com animais? | | | | | 1 | Sim | | 2 | Não | | 99 | Não sabe | | |
| 78 Se Sim, que animais? | 1 | Cão | 2 | Gato | 3 | Vaca | 4 | Porco | 5 | Cabrito | 6 | Rato | 4 | Outro, Especifique: |

| VII. ALTA E DESFECHO | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|---|----------|---|---|---------------------------------------|---|---|---------------------------------|--|---|----------|---|----|----------|
| 79 Data da alta: ____/____/____ | | | | | 85 Hora aproximada da alta: ____:____ | | | | | | | | | |
| | D | D | M | M | A | A | A | A | | H | H | M | M | |
| 80 Desfecho: | 1 | Melhorou | | 2 | Óbito | | 3 | Transferido para outro hospital | | 4 | Abandono | | 99 | Não sabe |

81 Comentários gerais: _____

82 Preenchido por: _____ . Data ____/____/____

D D M M A A A A

83 Revisto por: _____ . Data ____/____/____

D D M M A A A A